Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
Abteilung Arbeitsmedizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Weichardt

# UNTERSUCHUNGEN ZUR SPÄTALLERGIE-REAKTION DURCH BERYLLIUMVERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

**Günther Werle**
aus Waldshut

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0016

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
Abteilung Arbeitsmedizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Weichardt

# UNTERSUCHUNGEN ZUR SPÄTALLERGIE-REAKTION DURCH BERYLLIUMVERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

**Günther Werle**
aus Waldshut

1981

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Weichardt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145

Herrn Professor Dr. med. Heinz Weichardt, der mir das Thema der Arbeit freundlicherweise überlassen hat, danke ich dafür.

Besonderer Dank gilt Herrn Medizinaldirektor Professor Dr. med. Hans Zorn, an dessen Forschungsstelle in Stuttgart die Versuche durchgeführt wurden, für seine weitreichende und großzügige Unterstützung in jeder Phase meiner Arbeit.

Ferner sei Herrn Schatenberg gedankt für seine sachverständige Hilfe und seine Einsatzbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Geschichte und industrielle Verwendung des Berylliums.....1
2. Gesundheitsgefährdende Wirkungen des Berylliums.....2
3. Berylliumexposition im Beruf.....7
3.1 Epidemiologie 7
3.2 Arbeitsmedizinische Überwachung 8
4. Zum Maximale-Arbeitsplatz-Konzentrations-Wert (MAK-Wert).....10
5. Messung von Beryllium-Konzentrationen.....11
6. Toxikologie und Immunologie des Berylliums.....12
6.1 Toxikologie des Berylliums 12
6.2 Immunologie des Berylliums 13
7. Lymphozytentransformationstest.....16
7.1 Grundlagen der Immunologie 16
7.2 Blasttransformation 18
7.3 Kulturtechnik 18
7.4 Anwendung des Lymphozytentransformationstestes 20
7.5 Anwendung des Lymphozytentransformationstestes bei der Berylliose 20
8. Eigene Versuche.....22
8.1 Versuchsnotwendigkeit 22
8.2 Versuchsdurchführung 22
8.2.1 Exposition 22
8.2.2 Vorversuche 22
8.2.3 Lymphozytentransformationstest (LTT) 23
8.2.3.1 Blutentnahme 23
8.2.3.2 Lymphozytenisolierung und Kulturansatz 24
8.2.3.3 Ernte 26
8.2.4 Versuche an Menschen 26
8.2.5 Voraussetzungen für steriles Arbeiten 27
8.2.6 Benötigte Reagentien 27
8.3 Ergebnisse 29
9. Diskussion.....56
10. Zusammenfassung.....58
11. Literaturverzeichnis.....59

# 1. GESCHICHTE UND INDUSTRIELLE VERWENDUNG DES BERYLLIUMS

Beryllium wurde erstmals 1828 von Wöhler aus einem Berylliumerz dargestellt.

Benannt wurde das neue Element nach dem Halbedelstein Beryll, dem am längsten bekannten Ausgangsstoff der Berylliumherstellung, der in seiner reinsten Form als Aquamarin bezeichnet wird ($3BeO \cdot Al_2O_3 \cdot 6SiO_2$) (73,75). Beryllium ist ein silbrigweisses, leicht oxidierbares, sprödes Metall, das bei einer spezifischen Dichte von 1,84 $g/cm^3$ sehr leicht ist und dabei einen hohen Schmelzpunkt von 1285°C hat (68). Es besitzt neben günstiger elektrischer und thermischer Leitfähigkeit eine hohe Duktilität, das heißt beste mechanische Eigenschaften (72). Die industrielle Verwendung erfolgte erst 100 Jahre nach der Entdeckung und stieg von da bis heute stark an. Gefunden wird es als Beryll ($3BeO \cdot Al_2O_3 \cdot 6SiO_2$) in Südamerika, Südafrika und Indien mit einem Berylliumgehalt von 4 % und als Bertrandit ($Be_4Si_2O_2(OH)_2$) in den USA (Utah) mit einem Berylliumgehalt von weniger als 1 %. Die Herstellung erfolgt aus dem Erz durch Schmelzflußelektrolyse (73). In der Industrie wird Beryllium als Metall, als Oxid und in Form von Salzen verwendet. Das Metall wird, wegen seines geringen Gewichtes, der großen Härte und Stabilität, speziell in Luft- und Raumfahrttechnik verwendet. In einigen Anwendungsgebieten (optische Geräte, Trägheitssteuersysteme, Instrumente der Röntgen-, Neutronen- und $\gamma$-Strahlentechnik) kann es durch kein anderes Metall ersetzt werden.

Das Oxid ist sehr beständig, wird von Metallschmelzen kaum angegriffen und besitzt als ausgezeichneter elektrischer Isolator eine hohe Wärmeleitfähigkeit. Deshalb wird es zum Beispiel für Keramikteile der Elektronikindustrie verwendet.

Legierungen von Kupfer, Aluminium und Nickel mit Beryllium werden im allgemeinen mit einem Anteil von 2 - 4 % Beryllium verwendet, unter anderem für funkenfreie Werkzeuge (72,73).

Einen Überblick über die Anwendung gibt die Tabelle:

Industrielle Verwendung von Berylliumprodukten:

1. Nukleartechnik: Moderatorreflektoren; Neutronenquelle, -spiegel, -bremse; Röntgenröhren, -fenster.
2. Raumfahrttechnik: Feste Raketentreibstoffe, Hitzeschilde.
3. Flugzeug- und Automobilmotoren.
4. Elektrische Meßinstrumente, Federn, Kontakte, Kabel, Schalter, chirurgische Instrumente, Zahnprothetik.
5. Schweißgeräte, Elektroden, Schweißpulver.
6. Computertechnik.
7. Radio-, Phono-, Fernsehausrüstung.
8. Chemische Reagentien, Phosphorherstellung, keramische Produkte.

(5,24,89)

## 2. GESUNDHEITSGEFÄHRDENDE WIRKUNGEN DES BERYLLIUMS

Erst in diesem Jahrhundert wurde bei vermehrter Verwendung des Berylliums dessen gesundheitsgefährdende Wirkung erkannt, in den ersten Berichten nahm man eine Schädigung durch das Anion Fluor der Berylliumsalze an; erst später erkannte man die eigentliche Toxizität des Berylliums:

Weber und Engelhardt beschrieben 1933 Lungenparenchymschädigungen und Hautläsionen bei Arbeitern der Berylliumextraktion (37,72).
Hardy and Tabershaw veröffentlichten 1946 die erste Arbeit über die chronische Berylliose (49,73).

AKUTE WIRKUNGEN:

Akute Wirkungen im Bereich der Atemorgane:

Bei Einatmung höherer Konzentrationen von Salzen bzw. dem Oxid des Berylliums kommt es zur akuten Rhinitis, Pharyngitis, Tracheobronchitis und chemischen Pneumonitis (55). Nach der akuten Pneumonitis aber auch nach der Inhalation von Berylliumverbindungen über längere Zeit ohne akute Symptomatik kann sich mit unterschiedlich langer Latenz eine Berylliose entwickeln.

Wirkungen an der Haut:

Lösliche Salze führen zu Erscheinungen wie bei einer leichten Säureverätzung, die Therapie besteht in gründlichem Spülen.

Ebenso können aber auch allergische Dermatitiden auf Berylliumsalze auftreten. Sie sind charakterisiert durch Pruritus, Erythem und Ödem, das meist 'periorbital' anzutreffen ist. Seltener kommt es zu makulopapulösen und vesikulären Läsionen. Zur Therapie werden lokal Steroide appliziert, in schweren Fällen wird auch systemische Steroidbehandlung erforderlich.

Weichteilinkorporation:

Weichteilverletzungen, die mit Beryllium kontaminiert sind, weisen eine schlechte Heilungstendenz auf. Es kommt zu Ulcera mit verschorfendem Grund, geringer Sekretion und scharfer Begrenzung. Gelangen Salze unter die Haut, so kommt es zur Granulombildung, die auch, im Gegensatz zu den übrigen Hauterscheinungen, durch Berylliumoxid hervorgerufen werden kann.

Wirkung im Bereich der Schleimhäute:

An den Augenbindehäuten kommt es zur allergischen Blepharitis und bei Kontakt mit Berylliumsalzen zur Konjunktivitis (31,73,75,84).

CHRONISCHE SCHÄDIGUNG DER ATEMORGANE:

Die chronische 'Berylliumvergiftung' oder Berylliose wurde 1971 von der International Conference on Pneumoconiosis wie folgt definiert: *"A disease, resulting from pulmonary sensitization and responding with inflammatory changes, which tend to be granulomatous."* (zitiert nach 73)

Die chronische Schädigung wurde dort beobachtet, wo über längere Zeit 'niedrigere' Mengen an Berylliumoxid oder Berylliumsalzen eingeatmet wurden: In der Berylliumgewinnung, der $Be(OH)_2$-Kalzinierung, der BeO-Keramik-Herstellung und der Verarbeitung von Berylliumpulver, das an der Oberfläche spontan oxidiert. Die toxikologische Antwort hängt dabei ab von der Partikelgröße, der Oberfläche und dem Grad des Kalzinierens: Je höher die Kalzinierungstemperatur, desto geringer ist die Gewebereaktion, bei 1000°C fehlt sie ganz (26,80). Besonders tückisch ist die Latenzzeit zwischen Exposition und Erkrankung, die in Einzelfällen bis zu 25 Jahren betragen kann (15).

KLINIK DER BERYLLIOSE (73):

Am Beginn der Berylliose stehen uncharakteristische Beschwerden wie Husten und Müdigkeit. Später kommt es zur zunehmenden Lungeninsuffizienz, zu Gewichtsverlust und Anorhexie, Schwäche und einem hackenden, nichtproduktiven Husten mit brennendem Brustschmerz; gelegentlich kommt es zur Spleno- und Hepatomegalie. Es bildet sich in vielen Fällen ein Cor pulmonale aus.

Selten treten auch Gelenk- und Muskelschmerzen auf. In 20 % kommen, bedingt durch die Lungeninsuffizienz, Trommelschlegelfinger vor.

Tepper berichtet bei 6 von 15 Fällen einer Berylliose über eine Hyperuricämie. Tepper hält einen genetischen Faktor, der einerseits zur Hyperuricämie führt und andererseits eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Beryllium bedingt, für möglich (84).

Das Krankheitsbild der Berylliose entspricht klinisch der Boeck'schen Sarkoidose.

Fibrotische Formen der Berylliose führen zur Emphysembildung, wobei auch die Ruptur von Emphysemblasen und Spontanpneumothoraxbildung beschrieben wurden. (44)

RÖNTGENBEFUND DER BERYLLIOSE (15,73,84):

Röntgenologisch ist der Befund der Berylliose vielseitig, oft beginnt die Krankheit mit generalisierten, feingranulomatösen Verdichtungen, wie sie auch bei granulomatösen Lungenerkrankungen oder interstitiellen Pneumonien auftreten können. Diese untypischen frühen Verdichtungen vergrößern sich und konfluieren, es können auch hiläre Verschattungen auftreten.

Diese röntgenologischen Veränderungen, die nach Tepper gehäuft in den Oberfeldern auftreten, sind immer zu beobachten, gelegentlich gehen ihnen jedoch klinische und histologische Befunde voraus. Obgleich kaum eine Korrelation zwischen dem klinischen Stadium der Berylliose und der Schwere der röntgenologischen Veränderungen besteht, und somit der diagnostische Wert eingeschränkt ist, bleibt die regelmäßige Röntenuntersuchung exponierter Personen doch für die Vorsorgeuntersuchungen und die Verlaufsbeobachtungen unerläßlich.

Blutserologisch werden $\gamma$-Globulin-, Serumkalzium- und Blutsenkungsgeschwindigkeitserhöhungen berichtet (70). Die ersten Veränderungen der Lungenfunktion zeigen sich in einer Abnahme der Vitalkapazität.

PATHOLOGIE (44,73,84):

Die chronische Berylliose ist charakterisiert durch fibrotische Veränderungen im Interstitium und durch Granulome verschiedenen Ausmaßes. Histologisch finden sich asteroid bodies, kalzifizierte Einschlüsse, noduläre Läsionen und eine interstitielle Fibrose. Analog dem Boeck'schen Sarkoid sind die Hiluslymphknoten meist vergrößert (86,87,88).

Die anatomischen Veränderungen entsprechen nicht linear der Exposition, stimmen jedoch mit dem klinischen Verlauf überein (33).

BERYLLIUMGEHALT DER GEWEBE:

Der Gewebsgehalt an Beryllium ist bei der akuten Erkrankung höher als bei der Berylliose. Eine direkte Relation zwischen Krankheitsbild und Berylliumgehalt der Lunge konnte bislang nicht aufgezeigt werden. Im Gegenteil haben Arbeiter in der Beryllium-Industrie, die nicht erkrankten, oft beträchtlich höheren Berylliumgehalt im Lungengewebe als chronisch oder akut Erkrankte (17,28).

Das Beryllium in der Lunge kann ungleichmäßig verteilt sein (18).

Die Ausscheidung im Urin folgt direkt den Expositionsbedingungen, sagt aber nichts über eine eventuelle Berylliose aus (72,91).

DIFFERENTIALDIAGNOSE DER BERYLLIOSE (46,47,53,54,73):

Die Berylliose kann vielen chronisch-entzündlichen Prozessen der Lunge ähnlich sehen. So ist sie abzugrenzen gegenüber Pneumonien, Pneumokoniosen, Pilzerkrankungen, Lungenkarzinomatosen, Miliartuberkulose und Sarkoidose. Nach Hasan und Kazemi (53) gehört deshalb zur Diagnostik der Berylliose in jedem Fall:

- die Anamnese über berufliche Belastung, ergänzt durch die Information über Umgebungsdaten
- genaue klinische Beobachtung
- Röntgenthorax-Längsschnitt-Untersuchungen
- Lungenfunktionsprüfungen mit Bestimmung der Diffusionskapazität und Blutgasanalyse
- Lungenbiopsie und -histologie
- chemische Gewebsanalyse

Die positive Anamnese allein erscheint nach Ansicht von Bisbing, Dattoli und Lieben nicht ausreichend für die Diagnose (10).

THERAPIE DER BERYLLIOSE (73,84):

Die Therapie erfolgt mit Corticosteroiden, nach Tepper Prednison 15- 30 mg pro die. Dabei ist ein antibiotischer Schutz vor Superinfektionen erforderlich. Dadurch kann die Krankheit zum Stillstand gebracht werden. Nach Tepper hemmen Steroide jedoch die Entzündung und die an den Hiluslymphknoten lokalisierten Prozesse. Die Entwicklung einer Fibrose dürfte nicht wesentlich verhindert werden. Preuss berichtet über langjährige Erfolge bei Berylliosen, insbesondere bei Patienten mit einem der Sarkoidose identischen bzw. ähnlichen Röntgenbefund.

Therapieversuche mit Chelatbildnern und Immunsuppressiva hatten bisher keinen Erfolg (30). Die Letalität der Berylliose wird mit 35 % angegeben (52).

## 3. BERYLLIUMEXPOSITION IM BERUF

### 3.1 EPIDEMIOLOGIE (51,73)

Vor Einführung eines Grenzwertes der Berylliumkonzentration am Arbeitsplatz (1949 durch die AEC, Atomic Energy Commission) erkrankten 1 - 4 % der mit Beryllium Arbeitenden (90). Verletzungen, Operationen, Schwangerschaft oder andere Streßsituationen scheinen bei den Exponierten die Berylliose zu manifestieren.

Bei den sogenannten Umgebungsfällen, das heißt Personen, die in der Nähe einer Fabrik lebten und an Berylliose erkrankten, konnte immer ein direkter Kontakt über Kleiderreinigung der exponierten Arbeiter der Berylliumfabrik oder ähnliche Vorgänge nachgewiesen werden.

Frauen erscheinen in der Statistik anfälliger als Männer.

3.2 ARBEITSMEDIZINISCHE OBERWACHUNG (31,62,73):

Vor Beschäftigung mit einer exponierten Tätigkeit muß eine sorgfältige Anamnese und Untersuchung auf präexistente Risiken erfolgen. Nicht eingestellt werden sollten Personen mit einem der folgenden Risikofaktoren:

- Frühere Berufserkrankungen durch gesundheitsschädliche Stoffe im Bereich der Atemwege
- rekurrierende oder chronische Erkrankungen der Lunge
- Herzkrankheiten
- chronische Erkrankungen der Leber oder Milz
- Vitalkapazität unter 85 % des Normwertes
- Hauterkrankungen, vor allem Allergien

Untersucht werden muß die Vitalkapazität, die forcierte Vitalkapazität (FVC) und das forcierte exspiratorische Volumen nach einer Sekunde ($FEV_1$), ferner muß ein Röntgenbild (35,6 x 43,2 cm) der Lunge angefertigt werden. Bei der weiteren, jährlichen Überwachung wird das Röntgenbild, Körpergewicht, Vitalkapazität, FVC, $FEV_1$ kontrolliert und anamnestisch nach Atemsymptomen wie Kurzluftigkeit, Husten und Auswurf gefragt.

Für den BAT (biologischer Arbeitsplatztoleranzwert) ist der Berylliumgehalt im Blut und im Urin mittels flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie nach Zorn (92) zu bestimmen. In der Zukunft kann auch der Lymphozyten-Transformationstest oder der Leukozyten-Migrations-Inhibitionstest (LTT bzw. LMI) als BAT Bedeutung gewinnen. Die Daten dieser Untersuchung werden für retrospektive und prospektive Untersuchungen gespeichert und in den USA für 20 Jahre aufbewahrt, in der Bundesrepublik Deutschland erfolgt eine lebenslängliche Überwachung (auch nach der Berentung).

INDUSTRIEHYGIENE (72):

*"Empfehlenswert ist eine gewisse Isolierung des Beryllium-Kontrollbereiches, dessen Betreten nur über Schleusen mit Wasch- und Umkleideräumen möglich sein sollte."*

Für den Kontrollbereich gilt:

- 10 - 20 facher Luftwechsel pro Stunde
- Alle Fenster sind verschlossen zu halten
- Die gesamte Abluft muß gefiltert werden
- In den Geräten und Installationen darf keine Staubablagerung entstehen
- Wände, Decken und Böden müssen abwaschbar und leicht zu reinigen sein
- Alle Arbeitsgänge, bei denen berylliumhaltige Stoffe in fein verteilter Form entstehen, müssen in geschlossenen Apparaturen, 'Handschuhkästen', starken Abzügen, unter Abzugshauben oder Schnüffelabsaugungen durchgeführt werden. Sofern technisch möglich, ist die Naßverarbeitung vorzuziehen.
- Werden die zulässigen Berylliumkonzentrationen überschritten, so müssen Feinstaubmasken mit Filtern der Schutzstufe IIa getragen werden.
- Die Arbeitskleidung muß im Betrieb gereinigt werden
- Die Arbeiter müssen über die besonderen Probleme der Berylliumverarbeitung aufgeklärt werden.

## 4. ZUM MAXIMALE-ARBEITSPLATZ-KONZENTRATIONS-WERT (MAK-WERT)

Bei anderen toxischen Arbeitsstoffen gibt es einen sogenannten MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration), das ist die Konzentration, die auch bei achtstündiger Exposition pro Tag (45 Stunden pro Woche) nach derzeitiger Kenntnis gesundheitlich unbedenklich ist. Der erste derartige Wert, der für Beryllium aufgestellt wurde, war der amerikanische TLV (threshold limit value) von 2 µg/m³, der auch in der Bundesrepublik Deutschland bis 1973 als MAK-Wert galt.

Seit 1973 wurde für Beryllium kein MAK-Wert mehr angegeben, da Beryllium und seine Verbindungen in die Gruppe III $A_2$ der MAK-Werte-Liste aufgenommen wurde.

Gruppe III: Krebserzeugende Arbeitsstoffe
$A_2$: Stoffe, die bislang nur im Tierversuch sich nach Meinung der Kommission eindeutig als cancerogen erwiesen haben, und zwar unter Bedingungen, die der möglichen Exponierung des Menschen am Arbeitsplatz vergleichbar sind, bzw. aus denen Vergleichbarkeit abgeleitet werden kann (66).

## 5. MESSUNG VON BERYLLIUM-KONZENTRATIONEN (72,77):

Zur Beurteilung einer Gefährdung am Arbeitsplatz ist es wichtig, auch geringe Beryllium-Konzentrationen genau messen zu können. Wegen der chemischen Ähnlichkeit des Berylliums mit den Elementen der 3. Hauptgruppe des periodischen Systems gibt es kein spezifisches Reagenz zum chemischen Berylliumnachweis, deshalb sind physikalische Methoden für die quantitative Bestimmung besser geeignet.

Zur Zeit wird zur quantitativen Analyse die Atomabsorptionsspektrometrie angewendet. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,0008 µg, bei Verwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie bei 0,000 04 µg und kann noch weiter durch Zirkonbeschichtung der Graphitrohrküvette gesenkt werden.

Die empfindlichste Methode ist die Gaschromatographie (Nachweisgrenze 0, 000 004 µg), wobei zuerst das Beryllium zu einer Acetylfluorverbindung derivatisiert werden muß. Diese Methode eignet sich wegen des großen Aufwandes nicht als Routinemethode (25,32).

# 6. TOXIKOLOGIE UND IMMUNOLOGIE DES BERYLLIUMS

## 6.1 TOXIKOLOGIE DES BERYLLIUMS

Die Aufnahme berylliumhaltiger Stoffe in den Körper kann durch Resorption über die Lunge, den Magen-Darmkanal sowie über die Haut erfolgen.

Die Aufnahme über den Magen-Darmkanal ist sehr gering. Die Aufnahme über die Lunge ist eindeutig nachgewiesen und kann hier auch zur Schädigung führen.

Zorn und Diem konnten zeigen, daß Beryllium auch über die Haut aufgenommen werden kann (31).

Unabhängig vom Resorptionsort verteilt sich Beryllium im Körper auf bestimmte Organe, besonders hohe Konzentrationen finden sich in Muskeln, Nieren, Milz, Herz und Darm, wie durch Verwendung von neutronenmarkiertem $^{7}Be$ gezeigt werden konnte.

Wichtig ist die Abhängigkeit der Organverteilung von Streßsituationen:

Unter Streß nimmt der Berylliumgehalt der Knochen ab, in der Leber und der Lunge nimmt er zu. Hier könnte ein Zusammenhang mit der Auslösung bzw. Verschlechterung der Berylliose durch Streß bestehen (20).

Ausgeschieden wird Beryllium in erster Linie durch die Niere, ein beachtlicher Teil des Berylliums wird aber auch durch den Magen-Darmkanal eliminiert.

Die chronische Toxizität des Beryllium beruht biochemisch auf Wechselwirkungen mit Enzymen, vor allem wurde die Hemmung der alkalischen Phosphatase, der Phosphoglucomutase, Desoxythymidinkinase und der Milchsäuredehydrogenase beschrieben. Waseschi konnte ferner zeigen, daß Beryllium im Zellkern die DNA-Reduplikation hemmt, ohne an die DNA gebunden zu werden. Eiweiß- und RNA-Synthese wurden nicht gehemmt (59).

Höhere Beryllium-Konzentrationen inhibierten noch eine Reihe anderer Fermente; diese Wirkung dürfte jedoch weitgehend auf pH-Änderungen beruhen; ferner zeigte sich eine hämolytische Aktivität, die in der Lunge zum Hämosiderinniederschlag in den Kapillaren führen kann. (31,82,84)

## 6.2 IMMUNOLOGIE DES BERYLLIUMS

Der bereits erwähnte $\gamma$-Globulin-Anstieg im Serum bei der Berylliose sowie die erhöhte Anfälligkeit in Streßsituationen führte zu der Annahme einer allergischen Reaktion als der Berylliose zugrundeliegendem Phänomen (6,38).

Hanifin et al. stellten erste Untersuchungen über die Immunologie der Berylliose an und konnten zeigen, daß in Lymphozytenkulturen Sensibilisierter die Blasttransformationsrate durch $BeSO_4$-Zufuhr erhöht werden konnte (21.39,40).

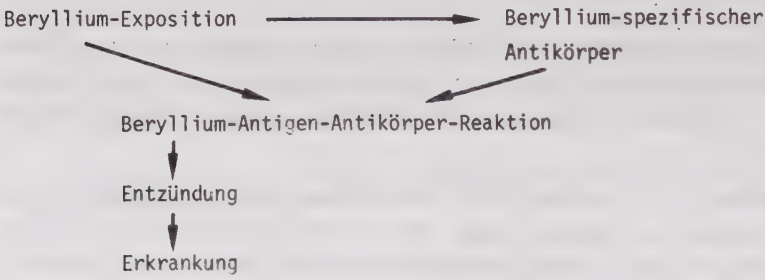
Deodhar, Barna und van Ordstrand konnten nachweisen, daß die Höhe des Anstiegs der Transformationsrate in positiver Korrelation zum klinischen Schweregrad der Erkrankung stand (6).

Weitere Hinweise für die immunologische Komponente bei der Berylliose sind in der Möglichkeit der Hautsensibilisierung zu sehen: Wiederholte intradermale Beryllium-Injektion löst bei Meerschweinchen eine Sensibilität vom verzögerten Typ aus, beim Hauttest kam es zur klassischen verzögerten Hautreaktion.

Die kutane Hypersensibilität war durch Lymphozyten und durch dialysierbare Leukozyten-Extrakte passiv übertragbar (78,81).

Unklar ist noch der Mechanismus, durch den Beryllium zum Antigen einer Immunreaktion wird. Belman untersuchte die Bindung von Beryllium an Hautbestandteile und fand, daß 46% der Hautbindung des Berylliums an die alkalische Phosphatase im stratum granulosum erfolgt. Auch die Nukleinsäuren der Haut binden Beryllium (8).

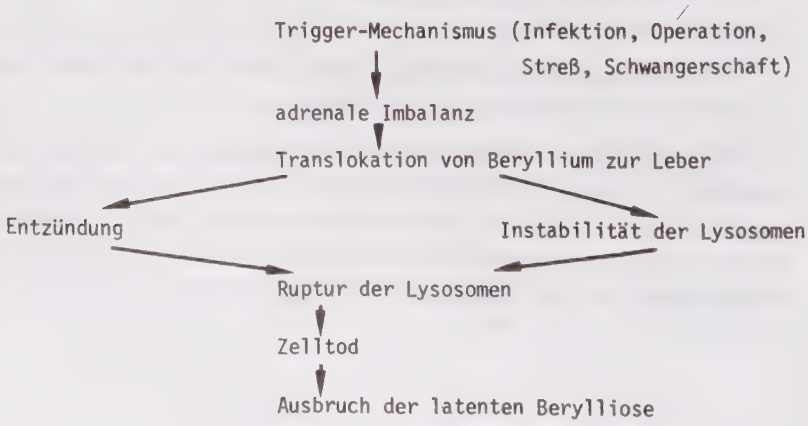
Zorn et al. zeigten, daß die Beryllium-Bindung im Blut zuerst an $\gamma$-Globulin, dann an Albumin erfolgt (78,81). Die Auslösung der Berylliose erfolgt darauf, nach Sterner und Eisenbud nach folgendem Mechanismus:




(35)

Die lange Latenz und die streßabhängige Auslösung der Berylliose erklärt sich nach Stokinger über einen Trigger-Mechanismus, der das Gleichgewicht der intrakorporalen Beryllium-Verteilung stört.

Mechanismus nach Stokinger (19,82):



Für diesen Mechanismus spricht, daß eine strenge Korrelation zwischen dem Beryllium- und dem Steroidgehalt in der Leber nachgewiesen werden konnte.

Die immunologische Genese der Berylliose ermöglichte auch eine spezifische Diagnostik, die de Curtis 1951 veröffentlichte:

Geringe Konzentrationen von löslichen Berylliumverbindungen führten im epikutanen Läppchentest bei Personen, die an chronischer Berylliose erkrankt waren, zu einerallergischen Reaktion.

Bei gesunden, nicht exponierten Kontrollpersonen blieb die Reaktion aus (27).

Da bei einer Wiederholung des Tests auch zuvor negative Personen positiv reagierten, muß man annehmen, daß der Läppchentest ebenfalls sensibilisieren kann.

Für die Diagnostik wird der de Curtis-Test deshalb nicht mehr angewandt, da er manifeste und latente Berylliosen aktivieren kann (38,47, 43).

# 7. DER LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTEST

## 7.1 GRUNDLAGEN DER IMMUNOLOGIE (7,61,63)

Neben der unspezifischen Abwehr durch Makrophagen, Interferon und andere Mechanismuen verfügt der Körper über ein spezifisches Abwehrsystem:

Das Immunsystem.

Die Immunabwehr des Organismus wird unterteilt in das humorale und das zelluläre Immunsystem: - die Immunität vermittelt durch die Antikörper im Blut und in den Körpersekreten (Speichel, Milch) und in die Immunität die durch Zellen vermittelt wird.

Hervorgerufen wird die Immunantwort durch sogenannte Antigene, hochmolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht von meist mehr als 10 000 µ, es kann sich um Proteine, Polysaccharide oder Lipopolysaccharide handeln. Eine Immunantwort ist auch auf niedermolekulare Substanzen, ja sogar auf anorganische Substanzen (zum Beispiel Chromat-Ionen bei der Chromatallergie der Maurer) möglich, Voraussetzung ist dabei die Bindung dieser als Haptene bezeichneten Substanzen an ein körpereigenes Trägerprotein.

Die Erlangung von Immunität ist nur möglich, wenn Lymphozyten vorhanden sind.

Die Lymphozyten werden eingeteilt in B- und T-Lymphozyten, beide gehen aus pluripotenten Stammzellen hervor, werden aber in der Embryonal- und Postnatalzeit in verschiedenen Organen ausgeprägt:

Die T-Lymphozyten im Thymus, die B-Lymphozyten vermutlich in den Peyer'schen Plaques und der Appendix, die als Äquivalent des Menschen zur Bursa fabricii der Vögel gelten. (Die Bursa fabricii ist der Reifungsort der B-Lymphozyten bei Vögeln, daher auch die Bezeichnung B-Lymphozyten.)

Die B-Lymphozyten vermitteln die humorale Abwehr, bei antigener Stimulation proliferieren die B-Lymphozyten zu großen, basophilen B-Immunoblasten, die sich teils zu antikörperbildenden Plasmazellen, teils zu kleinen Gedächtniszellen ('memory cells') weiter differenzieren.

Die Antikörper sind für die Sofortreaktion auf Antigene verantwortlich, die immunologische Erinnerung durch die Gedächtniszellen führt bei einem zweiten Antigenkontakt zu einer schnelleren und stärkeren Antikörperbildung: Boostereffekt.

Die T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Reaktion (Immunantwort vom verzögerten Typ), scheinen aber auch Einfluß auf die Antikörperbildung zu haben, ohne selbst Antikörper zu bilden. Auch sie bilden bei antigener Stimulation große Immunoblasten, die sich zu 'memory cells' und zu immunreaktiven, sensibilisierten T-Lymphozyten weiter differenzieren.

Die B-Lymphozyten sind überwiegend sessil in der Cortical- und Markregion der Lymphknoten und haben eine Lebensdauer von Wochen bis Monaten, während die T-Lymphozyten nach ihrer Ausprägung und Differenzierung rezirkulieren und den größten Teil der Lymphozyten im peripheren Blut ausmachen, ihre Lebensdauer beträgt mehrere Jahre.

Die humorale Antwort dient vor allem der Infektionsabwehr, hauptsächlich von Bakterien und Viren, die zelluläre Antwort findet sich ebenfalls bei Infektionen (zum Beispiel bei der Tuberkulose) aber auch bei der Transplantatabstoßung und der Tumorabwehr.

Der Abwehreffekt läßt sich bei der humoralen Abwehr durch Serumtransfusionen übertragen, er wird auch während der Stillzeit über die Milch von der Mutter auf den Säugling übertragen; die zelluläre Abwehr läßt sich nur durch T-Lymphozyten passiv übertragen.

Nachweisbar ist eine Sensiblität gegen ein Antigen

- durch Obertragung der Antikörper bzw. der T-Lymphozyten auf ein nicht sensibilisiertes Individuum, das dadurch sensibilisiert wird.
- durch einen Hauttest: intra- oder epikutane Applikation der Antigene löst eine Reaktion vom Soforttyp (humorale Antikörper) oder vom verzögerten Typ (zellvermittelte Immunität) aus.
- im Falle der zellvermittelten Reaktion durch den in-vitro-Nachweis der Blasttransformation in Lymphzellkulturen im Lymphozytentransformationstest oder im Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test.

## 7.2 BLASTTRANSFORMATION

Die bereits erwähnte Blasttransformation durch Antigene kann bei T-Lymphozyten auch unspezifisch durch PHA (Phythämagglutinin), einen Extrakt aus der roten Gartenbohne (Phaseolus vulgaris) ausgelöst werden: Die kleine runde Zelle mit rundem Zellkern vergrößert sich, der Kern lockert sich auf, es treten große unregelmäßige Nucleoli auf, kennzeichnend ist ferner die starke Basophilie des Zytoplasmas, in dem sich einzelne Vakuolen finden; bei der Transformation werden Mediatorsubstanzen, die Lymphokine, freigesetzt. In vivo findet die Blasttransformation der T-Lymphozyten in der paracorticalen Region der Lymphknoten statt, in der die sogenannten 'pyroninophilen' Zellen, zum Beispiel bei der Transplantatabstoßungsreaktion, auftreten.

Auch für B-Lymphozyten gibt es eine unspezifische transformationsauslösende Substanz: das Pokeweed Mitogen.

## 7.3 KULTURTECHNIK (4,59)

Die Stimulation der Blasttransformation kann in der Vollblutkultur oder in der Lymphozytenkultur erfolgen, die Entscheidung, ob eine Vollblut- oder eine Lymphozytenkultur gewählt wird, hängt von der Technik der Auswertung ab.

Soll eine Lymphozytenkultur angesetzt werden, so ist der erste Schritt die Lymphozytenisolierung, die durch Sedimentation in einem Medium bestimmter Dichte (d = 1,077) oder durch Filtration über Glasfiberfilter erfolgen kann. Die Kultur wird mit einem Nährmedium angesetzt, die stimulierende Substanz (PHA, Antigene), sowie als Referenz physiologische Kochsalzlösung hinzugegeben, und bei 37°C bebrütet.

Die Auswertung des Tests erfolgt:

- morphologisch durch mikroskopische Auszählung der Blasttransformationsrate im gefärbten Ausstrich.
- durch direkten Nachweis der gesteigerten mitotischen Aktivität und der dadurch gesteigerten DNA-Synthese mithilfe radioaktiv markierter Nukleotide, deren Einbau in die DNA nach entsprechender Aufbereitung der Zellen im Szintillationszähler gemessen wird.
- durch Nachweis der Lymphokinfreisetzung:
  - Lymphokine hemmen die Leukozytenmigration; gibt man Leukozyten durch eine Kapillare in das Kulturmedium, so bildet sich um die Kapillare ein Hof, der umso kleiner ist, je stärker die Migration gehemmt wird, das heißt je mehr Lymphokine freigesetzt wurden: Migrations-Inhibitions-Test MIT
  - Lymphokine verändern die negative Oberschußladung auf der Zelloberfläche von Makrophagen und damit die Zellwanderung im elektrischen Feld: Elektrophorese-Mobilitäts-Test EMT.

Die Ergebnisse des LTT können durch eine ganze Reihe anderer Faktoren beeinflußt werden. Zugrundegegangene Zellen, heterologes Serum und fetales Kalbsserum können eine Transformation ebenso auslösen wie Antibiotika, Hypoxie, $Zn^{++}$ - und $Hg^{++}$ - Ionen. Die Transformation wird gehemmt durch $Mn^{++}$ -, $Co^{++}$ -, $Cd^{++}$ -, $Cu^{++}$ - und $Ni^{++}$ - Ionen in $10^{-3}$ bis $10^{-7}$ molaren Konzentrationen, Verunreinigungen der Versuchsanordnung können also die Ergebnisse beeinträchtigen. (64)

## 7.4 ANWENDUNG DES LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTESTES

Der LTT wird klinisch angewandt zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von hämatologischen und immunologischen Krankheiten, sowie zur Allergietestung. Die Transformationsrate bei PHA-Stimulation in Kulturen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, Lymphosarkom, Rethothelsarkom oder Lymphogranulomatose ist signifikant vermindert, im Falle einer spontanen oder therapeutisch induzierten Remission steigt sie wieder an (3). Ebenso ist die Transformationsrate bei einer Thymusaplasie oder -dysplasie (Nezelof-, di- George-Syndrom) aber auch bei Multipler Sklerose und beim Morbus Down vermindert (57,65).

Die Allergietestung ermöglicht es, ohne Belästigung oder Gefährdung des Patienten, verschiedene Antigene auf ihre blasttransformationsstimulierende Wirkung zu untersuchen. Allerdings ist dabei zu beachten, daß eine Transformation bei Haptenen nur zu finden ist, wenn das Trägerprotein 'in-vitro' das gleiche ist wie 'in-vivo'. Ein negatives Testresultat schließt demnach eine bestehende Sensibilisierung gegen ein Hapten nicht aus.

Eine weitere Anwendung des LTT kann die Histokompatibilitätsprüfung sein:

In Mischkulturen zweier Personen ist die Transformationsrate, ohne PHA oder sonstigen Zusatz, abhängig von der Ähnlichkeit der Histokompatibilitätsgene, je weniger gemeinsame HLA (humane Leukozytenantigene) vorhanden sind, desto höher ist die Transformationsrate.

Der LTT kann somit auch in der Transplantationsimmunologie angewendet werden. (38)

## 7.5 ANWENDUNG DES LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTESTES BEI DER BERYLLIOSE

Nachdem Alekseeva und Vasil'eva an exponierten Meerschweinchen und Ratten eine Stimulierbarkeit fanden, zeigte Hanifin, daß auch bei Personen mit positivem Curtis-Test eine Stimulation durch BeO oder $BeSO_4$ möglich ist (2,21,85).

Die maximale Transformationsrate wurde bei Konzentrationen von 0,1 - 1 µg/ml erreicht, niedere Konzentrationen genügten nicht zur Stimulation, höhere wirkten toxisch. Nicht sensibilisierte Personen zeigten im LTT keine Transformation auf BeO oder $BeSO_4$. Deodhar untersuchte Patienten mit Berylliose, symptomfreie Berylliumarbeiter, nicht exponierte Personen und Patienten mit anderen Lungenerkrankungen. Dabei fand sich eine deutliche Korrelation zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und der Lymphozytentransformationsrate (6).

| Versuchsgruppen | Zahl | Grad der Transformation | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | neg. | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ |
| 1. Chronische Berylliose | 35 | 10 | 4 | - | 3 | 18 |
| 2. Gesunde Berylliumarbeiter | 30 | 28 | 2 | - | - | - |
| 3. Gesunde Normalpersonen | 22 | 19 | 2 | - | - | 1 |
| 4. Andere Lungenerkrankungen | 12 | 11 | 1 | - | - | - |

Bandtel und Zeller konnten im Tierversuch an Meerschweinchen und Ratten nachweisen, daß sich der LTT als screening-Test in der Diagnostik der Berylliose eignet (5,89).

# 8. EIGENE VERSUCHE

## 8.1 VERSUCHSNOTWENDIGKEIT

Zeller und Bandtel hatten im Tierversuch an Ratten und Meerschweinchen gezeigt, daß sich der Lymphozytentransformationstest zur Diagnostik der Berylliose eignet (5,89); andere Autoren hatten die Anwendbarkeit dieser Methode auf den Menschen gezeigt. Diese Methode, die mikroskopische Auswertung von gefärbten Zellausstrichen ist für eine routinemäßige Anwendung in der Überwachung exponierter Personen jedoch nicht geeignet, da das Arbeitsverfahren zu aufwendig ist. Um ausreichende Genauigkeit der Auswertung zu erreichen, muß jeder Ausstrich mehrfach durchgezählt werden, es müssen mindestens 1000 Zellen ausgezählt werden. Dieser Aufwand verringert sich bei Auswertung mit der Messung des Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden. Aufgabe dieser Arbeit war es, ein praktisch anwendbares Verfahren im Versuch an Tieren und Menschen zu finden und zu erproben.

## 8.2 VERSUCHSDURCHFOHRUNG

### 8.2.1 Exposition

Der Versuch wurde an weiblichen Wistarratten durchgeführt, die bereits von früheren Doktoranden (Zeller) exponiert worden waren:
*"Die gesamte Expositionsdauer betrug 70 Tage, wobei jeden Tag zwischen 6 und 8 Stunden, abhängig von der Pumpleistung, $BeSO_4$ eingesprüht wurde."* (89)

Die Konzentration in der Atemluft der Tiere wurde auf den früher gültigen MAK-Wert von 2 µg/m³ eingestellt.

### 8.2.2 Vorversuch

Bei 13 exponierten Ratten wurde als Vortest auf eine Sensibilisierung gegen Beryllium ein Hauttest nach Curtis durchgeführt:

In einer Kurznarkose mit Äther wurde den Tieren 0,1 ml/100g Körpergewicht Nembutal und 0,01 ml/100g Körpergewicht Atropinsulfat i.m.

injiziert. In der Narkose wurden beidseits des Nackens an einer Stelle, die die Tiere nicht belecken konnten, die Haare abrasiert. Die Narkose war notwendig, um die Tiere möglichst schonend, d.h. ohne Hautverletzungen, rasieren zu können.

Auf diese Stellen, Durchmesser ca. 2,5 cm, wurde auf einer Seite physiologische Kochsalzlösung, auf der anderen 0,32 %ige Berylliumfluoridlösung mit einem Wattebausch aufgetragen. Abgelesen wurde der Test nach 24 und nach 72 Stunden.

Starke Rötung, Bildung von Papeln oder Vesikeln wurde als positive Reaktion bewertet. Bei einigen Tieren wiesen Kratzefforeszenzen auf Juckreiz hin, es wurde jeweils die berylliumexponierte Stelle mit der kontralateralen negativen Kontrolle verglichen.

Von 13 Tieren starben 2 bei der Narkose, ein Tier zeigte keine Seitendifferenz zwischen exponierter und Kontrollstelle und wurde deshalb als negativ bewertet. 10 Tiere stellten sich als sensibel heraus, sie zeigten eine Rötung der ganzen exponierten Fläche und follikulär gebundene Papeln.

8.2.3 Lymphozytentransformationstest (LTT)

An den 10 im Curtistest als sensibel eingestuften Ratten wurde der LTT durchgeführt:

8.2.3.1 Blutentnahme

Mit einer elektrischen Pumpe wurde Luft, die durch Ethrane perlte, in einen Kunststoffkasten gepumpt. Die Versuchstiere wurden in diesen Kasten gesetzt, nach 2 bis 3 Minuten erschlafften sie und reagierten nicht mehr auf Beklopfen und Schütteln des Kastens. Von diesem Zeitpunkt an wurden sie noch 1 Minute in dem Kasten belassen.

Dann wurde mit einem heparinisierten Kapillar-Röhrchen, das in der Mitte angesägt und durchgebrochen worden war, damit ein scharfer Rand entstand, vom lateralen Augenwinkel her die hinter dem Auge liegenden Orbitalgefäße angestochen. Das Blut wurde in Eppendorf-Hütchen aufgefangen, in die pro Hütchen 0,1 ml Macrodex und 0,05 ml Vetren

gegeben worden war.

In jedem Hütchen wurde ca. 1 ml Blut aufgefangen. Jedem Tier wurde in einer Sitzung 1 bis 2 ml Blut abgenommen.

8.2.3.2 Lymphozytenisolierung und Kulturansatz

Für jede Blutprobe wurde ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 4 ml Ficoll-Reagenz gefüllt.

Ficoll wurde angesetzt mit 9,24 g Ficoll, 119,4 ml Ampuwa und 1 Ampulle Urovison, eine Stunde mit dem Magnetrührer verrührt und mindestens einen Tag stehen gelassen.

Das Ficoll wurde in die Zentrifugenröhrchen steril filtriert, verwendet wurden Milliporefilter mit einer Porenweite von 0,2 µ.

Das Blut wurde vorsichtig auf das Ficoll geschichtet und anschliessend 30 Minuten bei 333 g zentrifugiert, dabei setzten sich die Erythozyten ganz unten ab, darüber folgt ein Leukozyten-Ring, dann das Ficoll, über dem ein dünner Schleier, der die Lymphozyten enthält, liegt, zuoberst liegt das Serum.

Der Lymphozytenschleier wurde mit einer rechtwinklig gebogenen 12er-Kanüle abgesaugt und in ein Zentrifugenglas gegeben, dazu wurden 5 ml Hanks-Lösung gegeben. Es wurde 10 Minuten bei 150 g zentrifugiert, der Oberstand wurde abgekippt, wieder 5 ml Hanks-Lösung dazugegeben und erneut 10 Minuten zentrifugiert und der Oberstand abgekippt.

Die im Röhrchen verbliebenen Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium suspendiert.

Ansatz von Kulturmedium: 1 ml fetales Kalbsserum wurde bei 56°C im Trockenschrank 30 Minuten lang inaktiviert, 9 ml Medium RPMI, 0,1 ml L-Glutamatlösung, 0,1 ml eines Gemisches aus Penicillin und Streptomycin und das inaktivierte fetale Kalbsserum wurden zusammengegeben und gemischt.

Die in 1 ml Kulturmedium suspendierten Lymphozyten wurden mikroskopisch in der Zählkammer nach Bürker ausgezählt (es wurde das 40-er Objektiv verwendet), durch Zugabe entsprechender Mediummengen wurde die Zellzahl auf ca. $10^6$/ml eingestellt.

Die Kulturen wurden angesetzt in Micro-Titer-Platten der Firma Greiner mit flachem Boden.

Pro Blutprobe wurden 7 Löcher mit je 0,2 ml (=$2x10^5$ Zellen) der Zellsuspension gefüllt.

In Loch 1 kam kein Zusatz, in die Löcher 2 und 3 kamen zwei verschiedene Konzentrationen von PHA, in die Löcher 4 bis 7 vier verschiedene Konzentrationen von $BeCl_2$.

Die Platte wurde abgedeckt und in den Brutschrank gestellt. Der Kulturansatz wurde für 3 Tage bei 37°C bebrütet, im Brutschrank befanden sich Petrischalen voll Wasser, damit eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre entstand und die Verdunstung von Wasser aus dem Kulturansatz verhindert wurde.

Der Brutschrank wurde durchströmt von einem Gasgemisch, das 5 % $CO_2$, 20 % $O_2$ und 75 % $N_2$ enthielt.

PHA-Ansatz:

Die Stammlösung, erhalten durch Auflösen der Trockensubstanz in 5 ml Ampuwa gemäß Vorschrift, wurde 1:10 und 1:100 mit Ampuwa verdünnt, von diesen Verdünnungen wurden je 10 µl dem Kulturansatz zugegeben.

$BeCl_2$:

Die verwendeten Lösungen enthielten 0,1; 1; 10 bzw. 100 µg/100 ml, zugegeben wurden ebenfalls je 10 µl, sodaß die Endkonzentrationen in den Kulturansätzen 0,005; 0,05; 0,5 und 5 µl/ ml betrugen.

Nach drei Tagen wurde in jeden Kulturansatz 100 µl Methyl-$^3$H-Thymidin-Lösung gegeben, die aus der gelieferten Lösung mit 1 mC/ml durch Verdünnung 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden war, pro Ansatz wurde also 1 µC zugegeben. Die Kulturen wurden dann für 2 Stunden weiterbebrütet.

8.2.3.3 Ernte

Mit einer Eppendorf-Pipette wurde der Inhalt jedes einzelnen Loches aufgewirbelt und herausgesaugt, anschließend in ein Röhrchen mit 2,5 ml gekühltem PBS-Puffer gegeben, damit der Einbau unterbrochen wurde. Die Röhrchen wurden 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt. Pro Röhrchen wurden 3 ml Trichloressigsäure zur Eiweißfällung hinzugegeben, gründlich geschüttelt, um die Zellen zu suspendieren. Die Suspension denaturierter Zellen in Trichloressigsäure wurde durch Millipore-Filter mit einer Porengröße von 0,8 µ filtriert, es wurde mit ca. 3 ml Trichloressigsäure nachgespült. Die Filterblättchen wurden im Trockenschrank bei 80°C für 20 Minuten getrocknet, im Meßröhrchen mit 15 ml kalter Szintillationsflüssigkeit gegeben und gründlich geschüttelt.

Szintillationsflüssigkeit:

Anfangs wurde ein selbstgefertiger Szintillator, Toluol p.a. 1000 ml, 5 g PPO, 0,1 g POPOP verwendet, später ein Fertigszintillator von Serva, nachdem ein Vergleichsversuch gezeigt hatte, daß die Zählausbeute beider Szintillatoren gleich ist.

Zählung:

Die Zählung erfolgte auf einem Packard-Szintillations-Zähler im Katharinen-Hospital der Stadt Stuttgart über 10 Minuten je Zählröhrchen.

8.2.4 Versuche an Menschen

Der Versuch wurde auch an Menschen durchgeführt, die beruflich Umgang mit Beryllium hatten, es handelte sich um Mitarbeiter des Max-Planck-Institutes für Pulvermetallurgie in Stuttgart-Büsnau.

Beim Versuch am Menschen wurde das oben angegebene Verfahren folgendermaßen abgeändert:

In einer 10-ml-Einmalspritze wurden 0,5 ml Vetren und 0,1 ml Macrodex aufgezogen, das Blut wurde nach Venenpunktion in üblicher Weise entnommen, 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C stehengelassen, bis sich die Erythrozyten absedimentiert hatten und dann das Serum mit den darin

befindlichen Leukozyten vorsichtig abgesaugt und auf 6 ml Ficoll geschichtet. Zentrifugation, Lymphozytenabtrennung und Weitervervarbeitung erfolgten wie oben angegeben.

8.2.5 Voraussetzungen für steriles Arbeiten

Die Kulturen mußten steril angesetzt werden, deshalb wurde in einer Sterilbox gearbeitet, die bis auf die aufklappbare Vorderseite allseitig geschlossen war und von der Rückwand her mit gefilterter Luft durchströmt wurde.

Benötigte Geräte (Pipette, Bechergläser, Zentrifugenröhrchen, Glasspritze für die Filtration, Spitzen für die Eppendorf-Pipetten) wurden vor dem Beginn des Kulturansatzes bei 138°C und 2,5 atü im Autoklaven für 25 Minuten sterilisiert.

Die Sterilbox wurde gründlich mit Sterillium desinfiziert.

Alle nicht sterilisierbaren Geräte (Eppendorf-Pipetten, Sartorius-Membranfilter, Reagentiengefäße) wurden gründlich mit Sterillium desinfiziert, bevor sie in die Sterilbox eingebracht wurden.

8.2.6 Benötigte Reagentien

Sterillium zur Desinfektion

Zur Blutentnahme:
Vetren, Macrodex, ferner bei Ratten Ethrane zur Narkose

Zur Lymphozytentrennung:
Ficoll, Urovison, Ampuwa
Hanks'sche Lösung (Serva 47250)

Für die Kultur:
Nährmedium RPMI (Microbiological Association, Bethesda, Maryland)
TC-Penicillin-Streptomycin, Desiccated (Difco)
Ampuwa
L-Glutamat-Lösung
TC-Fetal Calf Serum
PHA-P (Serva)

$BeCl_2$-Lösungen
$^3H$-Thymidin TRA 1 mCi, Fa. Amersham und Buchler
sterile physiologische Kochsalzlösung
PBS-Puffer (Serva 47255)
Toluol p.a.
POPOP (1,4-Bis-2-(5-phenyl)-oxazoylbenzol)
PPO (2,5-Diphenyloxazol)
bzw. Fertigszintillator (Serva)
4 %ige Trichloressigsäure

Ferner wurden folgende Geräte benötigt:

Einmalspritzen und -kanülen
Einmal-Eppendorfhütchen
Eppendorf-Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
Sartorius-Membranfilter
Filterblättchen mit Porengröße 0,2µ
Filterblättchen mit Porengröße 0,8µ
Zentrifugenröhrchen
Szintillationsröhrchen
Pipetten ( 5 ml, 10 ml)
Pinzette
Bechergläser
Zentrifuge
Zählkammer nach Bürker
Mikroskop mit 40-er Objektiv
Brutschrank
Trockenschrank
Szintillationszähler:
Packard Tri-carb Liquid Szintillation Spectrometer
Model 3375 der Firma Packard Instruments
Downers Grove, Illinois, USA

## 8.3 ERGEBNISSE

An 9 Tieren wurde in Relation zur Exposition von 0,2µg/m³ bzw. bei 8 Menschen in Relation zu geschätzten Expositionsbedingungen der Lymphozytentransformationstest durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mittels der Messung des Einbaus von $^{3}H$-Thymidin. Die Auswertung ergab die in den folgenden Tabellen aufgeführten Daten.

Die ersten beiden Tabellen zeigen die einzelnen Versuchsergebnisse für jedes Tier und jede Versuchsperson, angegeben in Prozent vom Nullwert. Die folgenden Tabellen zeigen jeweils den Mittelwert aller Versuche bei einem Tier bzw. Mensch.

In der ersten Spalte steht der Wert ohne Stimulation, in der zweiten der Wert bei Stimulation durch PHA und in den folgenden Spalten die Werte bei Stimulation durch $BeCl_2$ in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1; 1; 10; 100 µg/ml $BeCl_2$.

TABELLE 1

| Versuchstier | Nullwert | cpm-Wert in Prozent vom Nullwert bei Stimulation durch | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PHA | 0,1 | 1 | 10 | 100 | µg/ml $BeCl_2$ |
| 1 | 100% | 88 | 55 | 65 | 98 | 72 | |
| | 100% | 94 | 78 | 85 | 68 | 94 | |
| 2 | 100% | 175 | 118 | 100 | 100 | 74 | |
| | 100% | 214 | 116 | 119 | 100 | 131 | |
| 3 | 100% | 67 | 102 | 104 | 102 | 90 | |
| | 100% | 95 | 79 | 85 | 79 | 96 | |
| | 100% | 90 | 84 | 91 | 104 | 82 | |
| 7 | 100% | 171 | 112 | 140 | 93 | 99 | |
| | 100% | 167 | 87 | 152 | 109 | 76 | |

Bei Tier 4,5,6,8 und 9 war jeweils nur 1 Messung möglich, siehe Tabelle 3 und 5

TABELLE 2

| Versuchsperson | Nullwert | cpm-Wert in Prozent vom Nullwert bei Stimulation durch | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PHA | 0,1 | 1 | 10 | 100 | µg/ml $BeCl_2$ |
| 1 | 100% | 361 | 131 | 89 | 77 | 123 | |
| | 100% | 315 | 163 | 101 | 112 | 144 | |
| 2 | 100% | 845 | 179 | 108 | 110 | 130 | |
| | 100% | 821 | 233 | 88 | 103 | 123 | |
| 3 | 100% | 452 | 160 | 176 | 172 | 175 | |
| | 100% | 372 | 143 | 164 | 182 | 155 | |
| 4 | 100% | 130 | 77 | 118 | 163 | 93 | |
| | 100% | 165 | 98 | 131 | 149 | 79 | |
| 6 | 100% | 4818 | 147 | 108 | 116 | 100 | |
| | 100% | 4650 | 177 | 138 | 120 | 97 | |
| | 100% | 3551 | 140 | 117 | 101 | 100 | |

Bei Versuchsperson 5,7 und 8 war jeweils nur eine Messung möglich, siehe Tabelle 4 und 6

TABELLE 3

| Versuchstier | Counts per minute (cpm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ohne Stimulation | mit Stimulation: durch PHA | durch 0,1 | durch 1 | durch 10 | durch 100 µg/ml $BeCl_2$ |
| Tier 1 | 146 | 132 | 90 | 108 | 123 | 117 |
| Tier 2 | 93 | 180 | 108 | 101 | 94 | 94 |
| Tier 3 | 134 | 112 | 118 | 125 | 123 | 121 |
| Tier 4 | 73 | 133 | 68 | 89 | 106 | 65 |
| Tier 5 | 131 | 255 | 124 | 127 | 104 | 139 |
| Tier 6 | 94 | 151 | 103 | 151 | 134 | 106 |
| Tier 7 | 108 | 183 | 107 | 117 | 111 | 91 |
| Tier 8 | 80 | 139 | 88 | 94 | 103 | 116 |
| Tier 9 | 51 | 346 | 62 | 168 | 100 | 118 |

TABELLE 4

| Versuchs-person | Counts per minute (cpm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ohne Stimulation | mit Stimulation: durch PHA | durch 0,1 | durch 1 | durch 10 | durch 100 µg/ml $BeCl_2$ |
| VP 1 | 124 | 417 | 196 | 130 | 150 | 195 |
| VP 2 | 131 | 1087 | 235 | 128 | 137 | 163 |
| VP 3 | 112 | 484 | 165 | 189 | 198 | 184 |
| VP 4 | 179 | 265 | 152 | 206 | 179 | 157 |
| VP 5 | 115 | 160 | 123 | 154 | 301 | 299 |
| VP 6 | 149 | 6533 | 229 | 179 | 167 | 147 |
| VP 7 | 64 | 244 | 152 | 73 | 78 | 113 |
| VP 8 | 96 | 731 | 126 | 156 | 113 | 124 |

TABELLE 5

Rechnet man die angegebenen cpm-Werte in Prozent-Werte vom Nullwert, dem Wert ohne Stimulation, um, so erhält man die folgenden Werte:

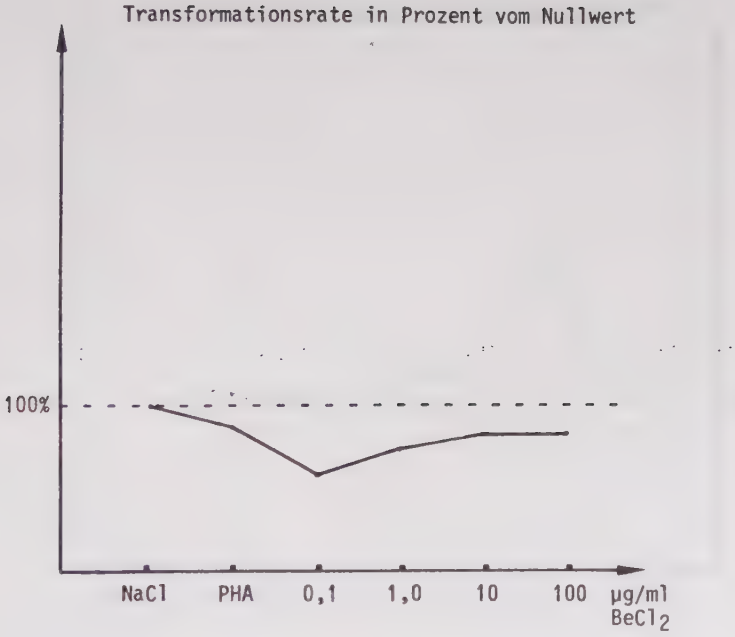
| Versuchstier | Nullwert | Stimulation durch: PHA | 0,1 | 1 | 10 | 100 µg/ml $BeCl_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tier 1 | 100% | 91 | 62 | 75 | 83 | 83 |
| Tier 2 | 100% | 194 | 117 | 109 | 102 | 103 |
| Tier 3 | 100% | 84 | 88 | 94 | 95 | 89 |
| Tier 4 | 100% | 183 | 94 | 123 | 146 | 90 |
| Tier 5 | 100% | 196 | 95 | 97 | 80 | 106 |
| Tier 6 | 100% | 161 | 109 | 161 | 143 | 113 |
| Tier 7 | 100% | 167 | 100 | 146 | 101 | 87 |
| Tier 8 | 100% | 174 | 110 | 118 | 129 | 146 |
| Tier 9 | 100% | 685 | 124 | 333 | 198 | 234 |

TABELLE 6

| Versuchs-person | Nullwert | cpm-Wert in Prozent vom Nullwert bei Stimulation durch PHA | 0,1 | 1 | 10 | 100 µg/ml $BeCl_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VP 1 | 100% | 338 | 157 | 95 | 95 | 134 |
| VP 2 | 100% | 833 | 176 | 99 | 106 | 127 |
| VP 3 | 100% | 415 | 152 | 170 | 177 | 165 |
| VP 4 | 100% | 148 | 85 | 124 | 106 | 86 |
| VP 5 | 100% | 139 | 107 | 134 | 263 | 261 |
| VP 6 | 100% | 4378 | 154 | 121 | 112 | 99 |
| VP 7 | 100% | 382 | 237 | 114 | 122 | 177 |
| VP 8 | 100% | 760 | 131 | 163 | 118 | 129 |
| Der Mittelwert aller Tiere bzw. Versuchspersonen, in Prozent angegeben, beträgt: | | | | | | |
| Tiere | 100% | 215 | 100 | 156 | 120 | 117 |
| VPn | 100% | 924 | 150 | 127 | 137 | 147 |

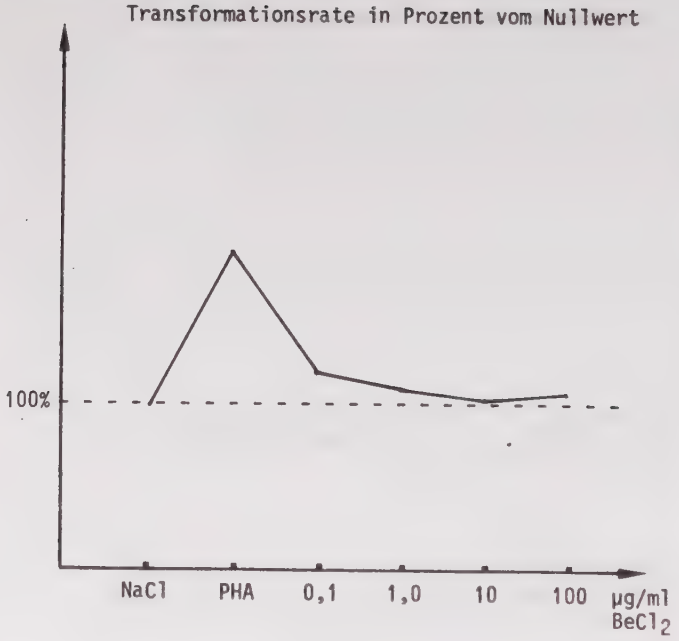
In den folgenden Graphiken sind die Ergebnisse der Versuche für jedes einzelne Versuchstier und für jede einzelne Versuchsperson sowie die Mittelwerte aller Versuchstiere und aller Versuchspersonen in Prozent vom Nullwert (ohne Stimulation) dargestellt.

TIER 1



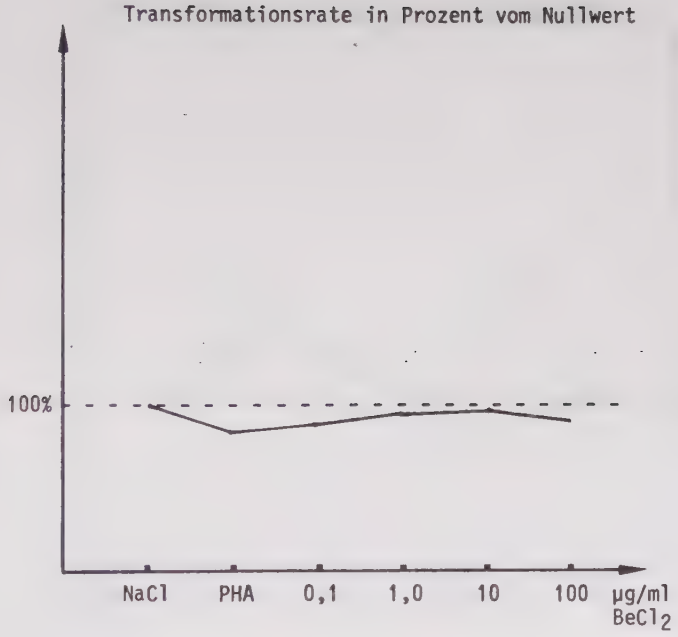

Bei Tier 1, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine Depression der Immunantwort.

TIER 2



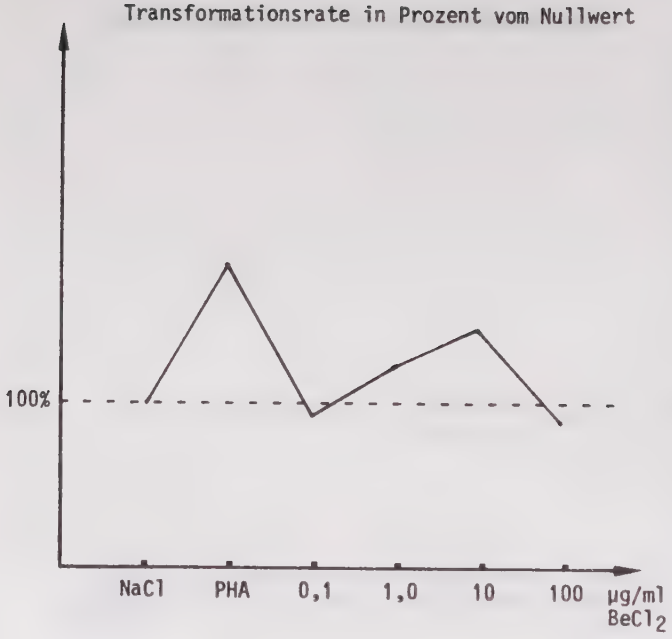

Bei Tier 2, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA, jedoch keine Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

TIER 3



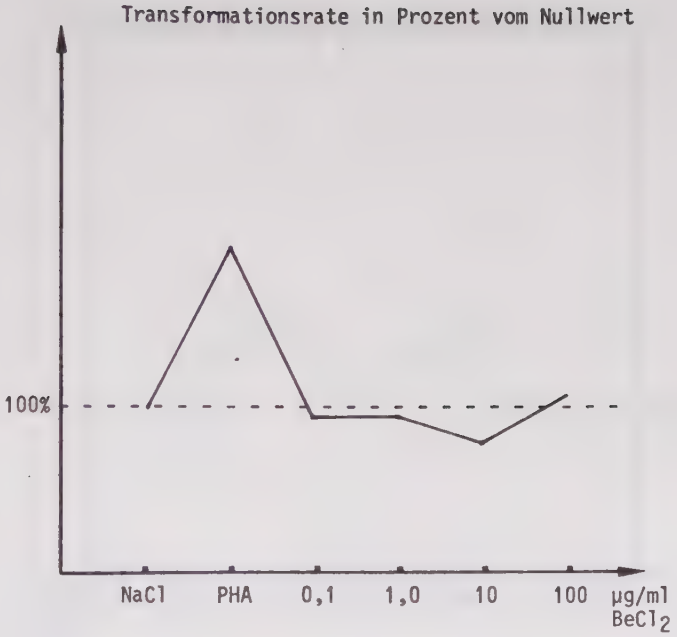

Bei Tier 3, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine Depression der Immunantwort.

TIER 4



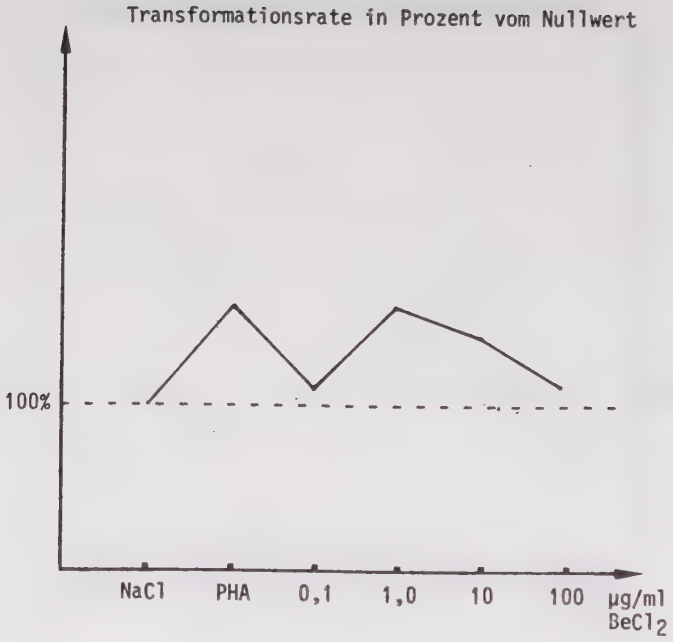

Bei Tier 4, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

TIER 5



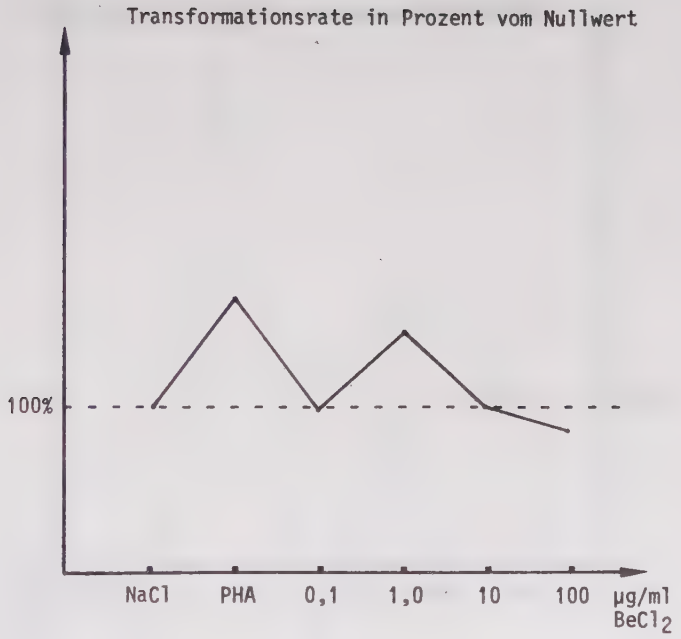

Bei Tier 5, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA, jedoch keine Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

TIER 6



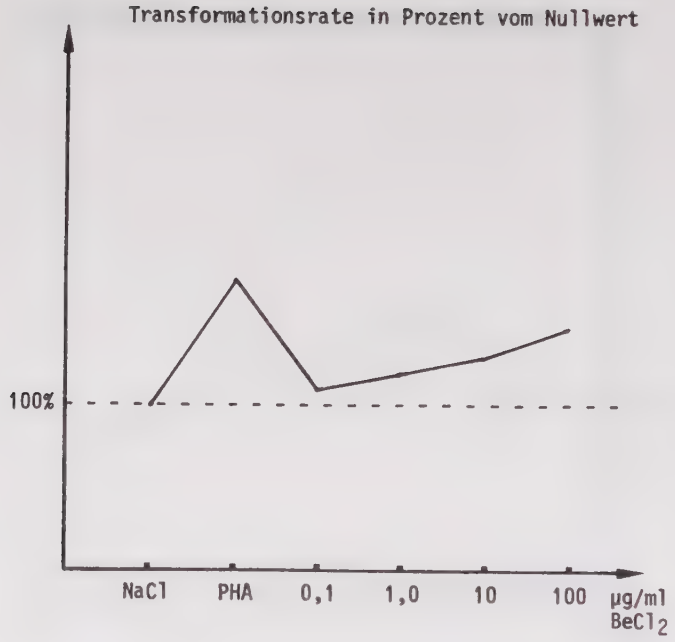

Bei Tier 6, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

TIER 7




Bei Tier 7, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

TIER 8

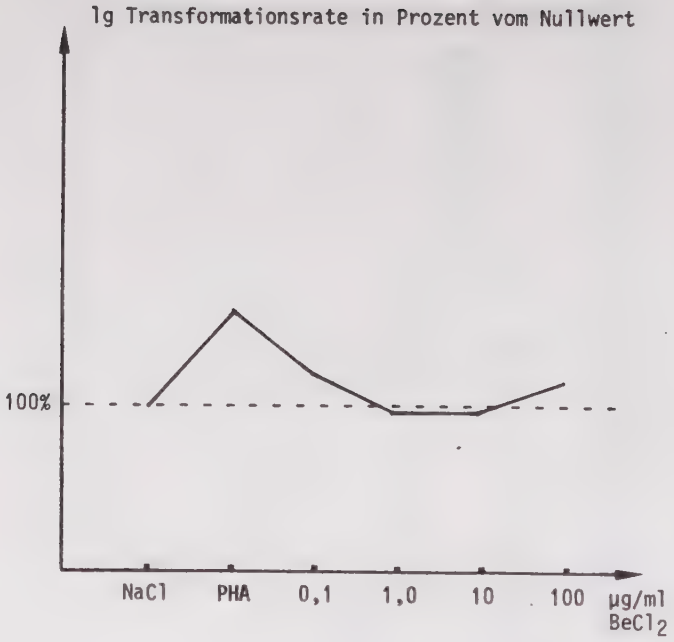



Bei Tier 8, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

TIER 9

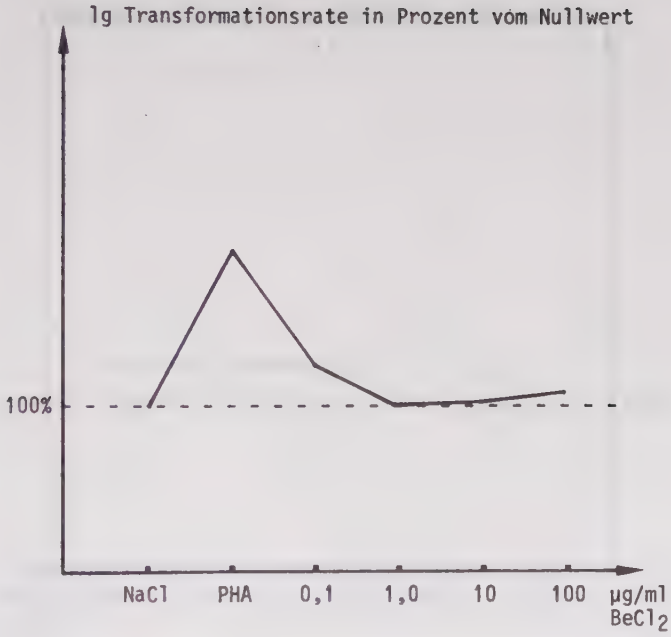
Bei Tier 9, das mit $BeSO_4$ exponiert worden war, fand sich ein Jahr nach der Exposition im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 1



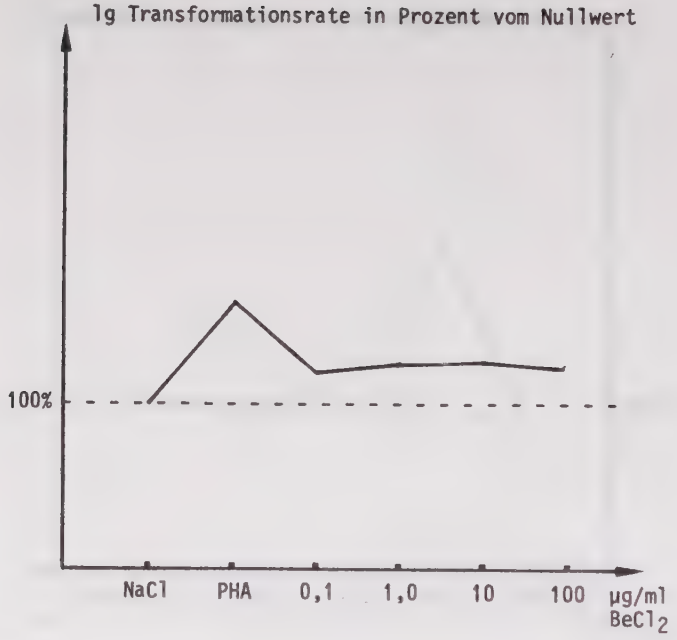

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 1 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und eine geringe Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 2



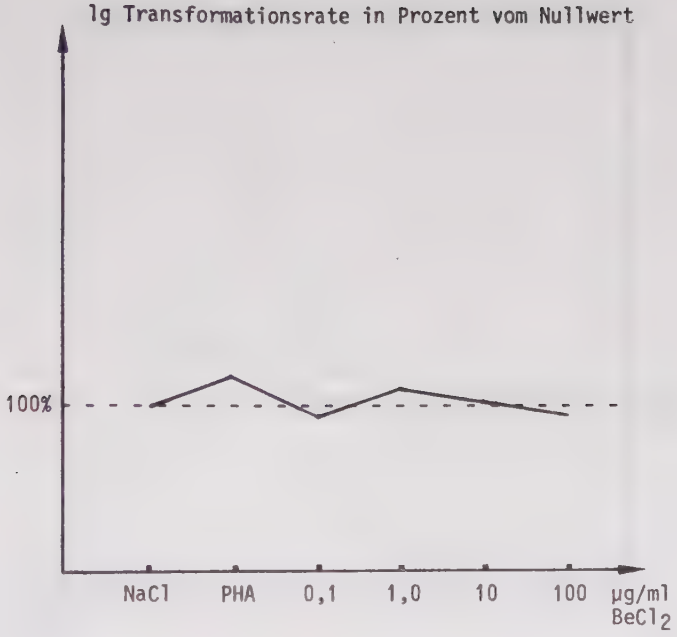

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 2 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und eine geringe Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 3



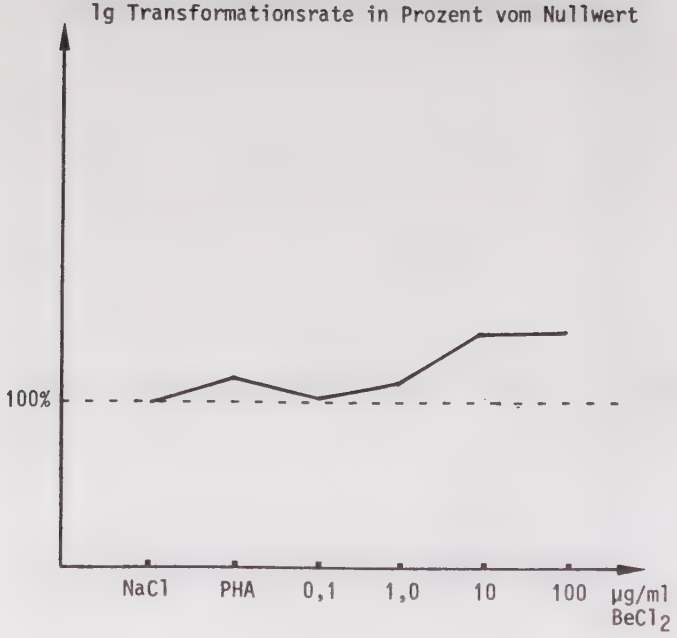

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 3 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 4



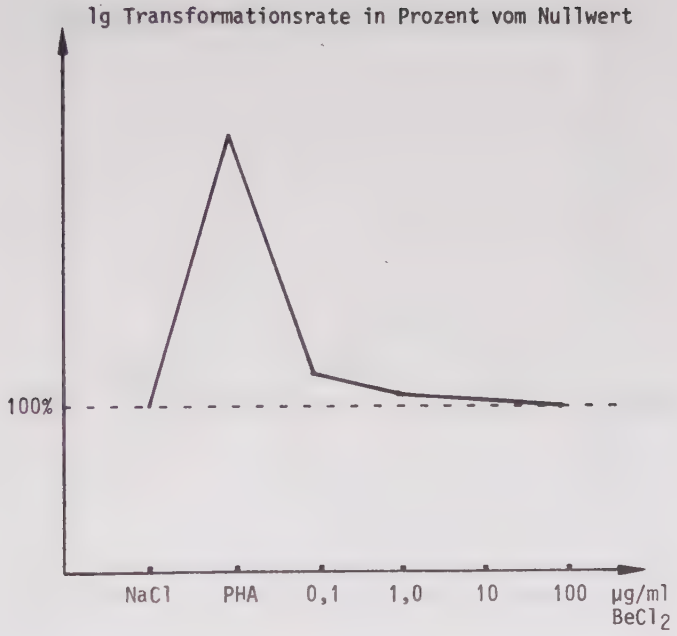

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 4 zeigte sich im LTT eine geringe Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 5



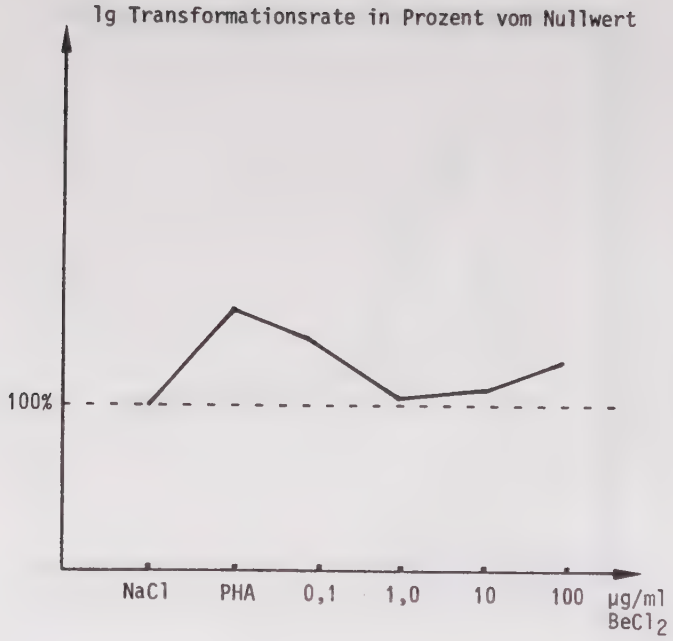

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 5 zeigte sich im LTT eine geringe Stimulierbarkeit durch PHA und eine positive Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 6



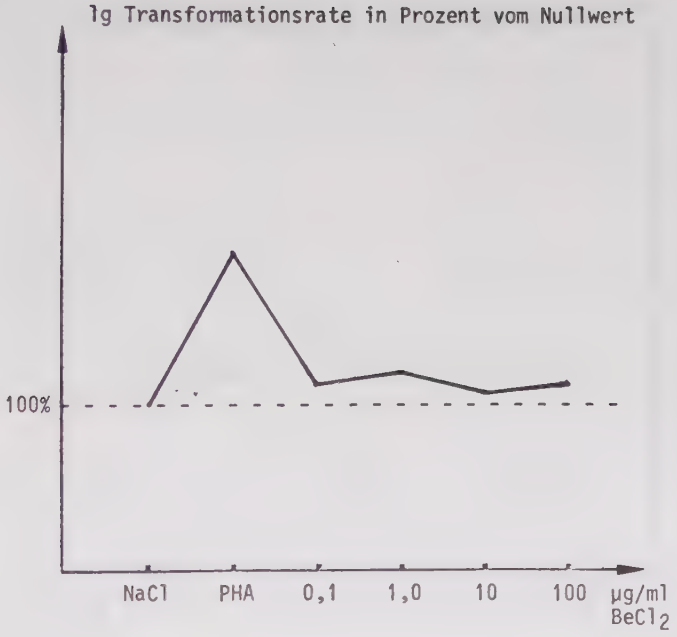

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 6 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und eine geringe Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 7



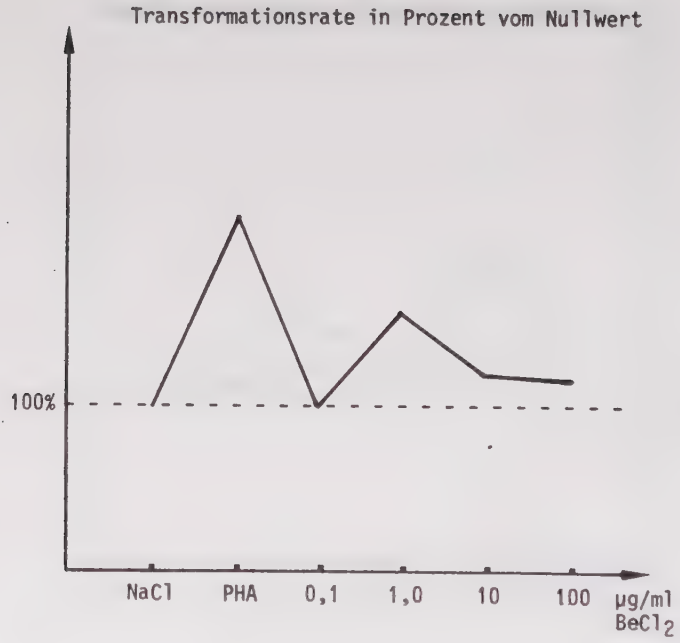

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 7 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

VERSUCHSPERSON 8



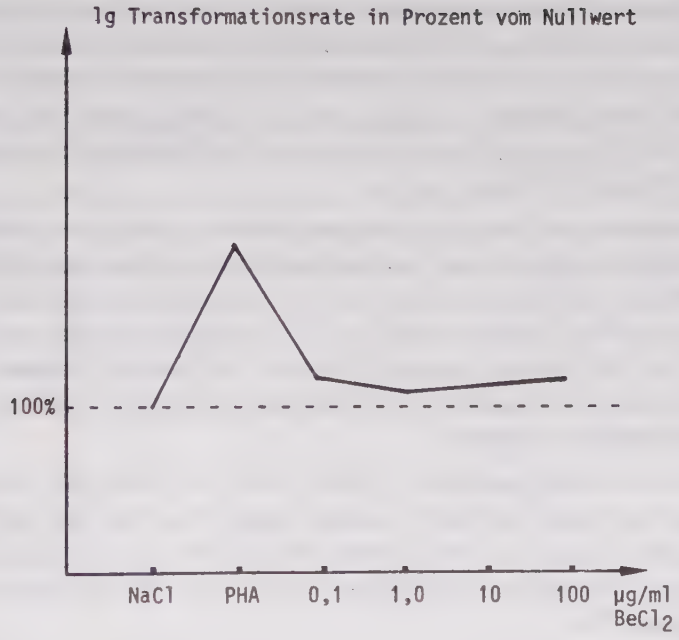

Bei der berylliumexponierten Versuchsperson 8 zeigte sich im LTT eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und eine geringe Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

MITTELWERT ALLER VERSUCHSTIERE




Der Mittelwert der Transformationsraten aller mit $BeSO_4$ exponierten Versuchstiere zeigt eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und durch $BeCl_2$.

MITTELWERT ALLER VERSUCHSPERSONEN




Der Mittelwert der Transformationsraten aller Versuchspersonen, die Umgang mit Beryllium hatten, zeigt eine positive Stimulierbarkeit durch PHA und eine geringe Stimulierbarkeit durch $BeCl_2$.

## 9. DISKUSSION

Da von den neun exponierten Tieren drei bei der Narkose zur Blutentnahme starben, die übrigen sechs schon bald nach Versuchsbeginn eingingen und weitere exponierte Tiere nicht zur Verfügung standen, war es nicht möglich, an den Tieren mehrere Messungen durchzuführen. Damit war auch eine statistische Analyse der Ergebnisse nicht möglich. Bei den Ratten handelte es sich um sehr alte Tiere, sodaß die insgesamt niedrige Zählrate der Tierversuche durch die altersbedingte Immunschwäche verursacht sein dürfte.

Nachdem Bandtel und Zeller im Versuch mit mikroskopischer Auswertung und Barna, Deodhar und van Ordstrand im Versuch mit der $^3$H-Thymidin-Methode nachweisen konnten, daß eine Steigerung der Transformationsrate durch Berylliumsalz-Zugabe bei nicht exponierten Tieren und Menschen nicht erfolgt, erschien es gerechtfertigt, auch geringe Zunahmen der Transformationsrate gegenüber der negativen Kontrolle als Zeichen der Sensibilisierung zu werten.

Von 9 mit $BeSO_4$ exponierten Tieren, die im de Curtis-Test eine spätallergische Antwort auf $BeCl_2$ gezeigt hatten, fand sich bei 6 der Tiere eine Stimulation durch PHA und $BeCl_2$. Diese Tiere zeigten sowohl die Fähigkeit zur Lymphozytentransformation wie auch eine Sensibilisierung gegen Beryllium.

Zwei Tiere (Tier 1 und 3) waren weder durch PHA noch durch Beryllium stimulierbar, das heißt, sie zeigten eine allgemein herabgesetzte Immunität; dieser Befund stimmt mit einer Untersuchung von Shakova und Sokolov überein, in der gefunden wurde, daß stark berylliumexponierte Tiere einen Verlust der Lymphozytentransformationsfähigkeit aufweisen (79).

Ein Tier (Tier 5) war gut gegen PHA, nicht jedoch durch Beryllium stimulierbar.

Von 8 berylliumexponierten Versuchspersonen erwiesen sich deren T-Lymphozyten als gut stimulierbar durch PHA und auch durch Beryllium.

Es handelte sich um Personen, die seit 3 - 5 Jahren Umgang mit Beryllium hatten und nur ca. 1 - 2 mal im Jahr eine über den früheren MAK-Wert erhöhte Beryllium-Aufnahme von 1 - 2 Stunden Aufenthalt in 0,3 - 0,5 µg/m³ Luft hatten.

Die Ergebnisse stimmen mit denen anderer Doktoranden überein, die die Eignung des Lymphozytentransformationstestes als 'screening'-Methode zur Früh-Diagnostik der Berylliose bereits zeigen konnten.

Da aber die morphologische Auswertung unter dem Mikroskop zu aufwendig ist für eine Routine-Untersuchung in einem betriebsärztlichen Dienst, bietet sich zu diesem Zweck die Auswertung des Lymphozytentransformationstestes durch die Messung des Einbaus von $^{3}H$-Thymidin eher an, da hierbei der Arbeitsaufwand geringer ist und die Subjektivität der Auszählung wegfällt.

## 10. ZUSAMMENFASSUNG

Von 11 mit $BeSO_4$ exponierten Ratten erwiesen sich 10 Tiere im Hauttest nach de Curtis als sensibel. An neun exponierten Tieren und acht exponierten Menschen konnte gezeigt werden, daß der Lymphozytentransformationstest, ausgewertet durch die Einbaumessung von $^3$H-Thymidin, zur Diagnostik einer Sensibilität gegen Beryllium und damit als 'screening'-Untersuchung auf eine Berylliose geeignet ist. Im Vergleich mit der mikroskopischen Auswertung, wie sie früher durchgeführt worden war (5,89), erreichte die $^3$H-Thymidin-Methode eine annähernd gleich gute Genauigkeit.

Da diese Methode nicht sehr aufwendig ist, sollte neben Luft- und Ausscheidungsanalysen von Beryllium auch diese Methode bei sicher Exponierten zur routinemäßigen Oberwachung in Erwägung gezogen werden. Bei der Untersuchung von acht Menschen, die über mehrere Jahre geringfügig (maximal kurzfristig 0,3 - 0,5 µg/m³ Luft) exponiert waren, konnte bei allen ein leichter Anstieg der Lymphozytentransformationsrate festgestellt werden.

## 11. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aldinger, F., Petzow, G.
RADEX-Rundschau, Heft 3/4, 275-283, (1972)

2. Alekseeva, O.G.
Ability of Beryllium Compounds to Cause Allergy of the Delayed Type
Gig. Tr. Prof. Zabol, 9, 2= (1965)

3. Aust, C., Boll, I. Kötter, R.
Die Phytohämagglutininkultur als Test zur Verlaufskontrolle lymphoproliferativer Erkrankungen
Dtsch. Med. Wschr. 99, 678-684 (1974)

4. Ax, W., Johannsen, R.
Testmethoden zellvermittelter Immunreaktionen
Laboratoriumsblätter 27, 8-17 (1977)

5. Bandtel, K.-J.
Der Lymphozyten-Transformations-Test und seine Bedeutung für die Früherkennung der chronischen Berylliose
Dissertation, Tübingen, (1976)

6. Barna, B., Beodhar, S.D., Van Ordstrand, H.S.
A Study of the Immunologic Aspects of Chronic Berylliose
Chest 63, 3, 309-313, (1973)

7. Begemann, H., Theml, H.
Lymphozyt und klinische Immunologie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1975)

8. Belman, S.
Beryllium Binding of Epidermal Constituents
J. Occup. Med. 11.4 175-182 (1969)

9. Berger, N.A., Skinner, A.M.
Characterization of Lymphozyte Transformation Induced by Zinc Ions
J. Cell Biol. 61, 45-55 (1974)

10. Bisbing, J., Dattoli, J.A., Lieben, J.
Chronic Beryllium Disease - A Follow-up Study
J. Occup. Med. 6, 189-194, (1964)

11. Burrell, R., Marx, J.J.Jr.
Delayed Hypersensitivity to Beryllium Compounds
J. Immunol. 111, 2 590-598 (1973)

12. Busby, E.K., Krivanek, N.D., Reeves, A.L., Swanborg, R.H.
The Role of Immunologic Reactions in Pulmonary Berylliosis
Inhaled Particles III, Surrey, (1971)

13. Busby, E.K., Krivanek, N.D., Reeves, A.L., Swanborg, R.H.
Immunity to Pulmonary Berylliosis in Guinea Pig
Int. Arch. Arbeitsmed. 29, 209-220, (1972)

14. Byers, V.S., Epstein, W.L.
Transfer of Contact Sensitivity to Beryllium Using Dialyzable
Leukocyte Extracts (Transfer Factor)
J. Allergy Clin. Immunol. 63, 111-115 (1979)

15. Chamberlin, R.J., Hardy, H.L.
The Toxicity of Beryllium
USPHS Publication Nr. 2173, 5-17, (1972)

16. Chamberlin, R.J., Hardy, H.L., Tepper, L.B.
Toxicity of Beryllium Compounds
Elsevier, Amsterdam (1961)

17. Cholak, J.
The Analysis of Traces of Beryllium
AMA, Arch. Ind. Health 19, 205, (1959)

18. Cholak, J., Dutra, F.R., Hubbard, D.M.
The Value of Beryllium Determination in the Diagnosis of Berylliosis
Amer. J. Clin. Pathol. 19, 229, (1949)

19. Clark, J.J., Stokinger, H.E.
The Mechanism of Delayed Biologic Response Following Beryllium Exposure
J.Occup. Med. 15, 3, 255-159, (1973)

20. Cleave, C.D.
Distribution, Retention and Elimination of $^{7}$Beryllium in Rats after Intratracheal Injection
Arch. Ind. Health 11, 375, (1955)

21. Cline, M.J., Epstein, W.L., Hanifin, J.M.
In-Vitro-Studies of Granulomatous Hypersensitivity to Beryllium
Invest. Dermatol. 55, 284-288, (1970)

22. Cralley, L.J.
Air Sampling and Analysis
USPHS Publication Nr. 2173, 37-41, (1972)

23. Cralley, L.J.
Industrial Hygiene Control
USPHS Publication Nr. 2173, 41-47, (1972)

24. Cralley, L.J.
Uses and Industrial Exposure
USPHS Publication Nr. 2173, 1-5, (1972)

25. Criteria for a recommended standard
Occupational Exposure to Beryllium
NIOSH-Publication No. HSM 72-10268, (1972)

26. Criteria Document
Recommended Standard of Threshold Limit Value
NIOSH-Publication, Washington, (1977)

27. Curtis, G.H.
The Diagnosis of Beryllium Disease with Special Reference to the Patch Test
Arch. Ind. Hyg. 19, 150, (1959)

28. Dattoli, J.A., Lieben, J., Vought, V.M.
Quantitative Beryllium Studies in Postmortem Lungs
Arch. Environ. Health, 7, 183, (1963)

29. Deodhar, S.H.
A Study of the Immunologic Aspects of Chronic Berylliosis
Chest, 63, 309-313, (1973)

30. Dequidt, J., Haguenoer, J.M.
Action de quelques detoxicants dans l'intoxication expérimentale par le Bêryllium
Arch. Maladies profess. Méd. Travail Sécurité soc.
34, 493-502, (1973)

31. Diem, H., Zorn, H.
Die Bedeutung des Berylliums und seiner Verbindungen für den Arbeitsmediziner
Zbl. Arbeitsmed. 24, 3-8, (1974)

32. Donaldson, H.M., Hiser, R.A., Schwenzfeier, C.W.
Analysis of Beryllium in Air
Am. Ind. Hyg. Assn. J. 25, 69, (1964)

33. Dudley, H.R.
The Pathologic Change of Chronic Beryllium Disease
Arch. Ind. Health, 19, 184, (1959)

34. Eder, M., Gedigk, P.
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie
29. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1975)

35. Eisenbud, J., Sterner, J.H.
Epidemiology of Beryllium Intoxication
Arch. Ind. Health 4, 123-151, (1951)

36. Enderin, F., Harder, F.
Transplantationen
in Allgöwer, M.: Allgemeine und spezielle Chirurgie
3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 496-524, (1976)

37. Engelhardt, W.E., Weber, H.H.
Anwendung bei der Untersuchung von Stäuben aus der Beryllium-gewinnung
Zbl. f. Gewerbehygiene und Unfallverhütung, 10, 41, (1933)

38. Epstein, W.L., Fukujama, K., Henderson, W.R., Spitter, L.E.
In Vitro Demonstration of Delayed Hypersensitivity in Patients with Berylliosis
J. Invest. Dermatol. 58, 5, (1972)

39. Ermakova, N.G.
Assessment of the T-Lymphozyte-Population in Persons Exposed to Beryllium Compounds
Gig. Tr. Prof. Zabol 10, 52-54, (1977)

40. Ermakova, N.G., Vasil'eva, E.V.
Determination of the T- and B-Lymphozyte Population in Occupational Exposure to the Chemical Allergen Beryllium
Gig. Tr. Prof. Zabol 4, 32-35, (1978)

41. Fischer, R., Schaefer, H.E.
Alkalische Phosphatase als zytochemischer Parameter zur Differenzierung verschiedener Lymphozytenklassen
Verh. Dtsch. Ges. Path. 57, 293-297 (1973)

42. Fischer, R., Niederalt, G., Schaefer, H.E.
Alkalische Phosphatase in Lymphozyten
in Pietschmann, H.: Der Lymphozyt
Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, (1972)

43. Folesky, H., Zschunke, E.
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Sensibilisierung gegen Beryllium
Hautarzt 20, 403-404, (1969)

44. Freeman, D.G., Hardy, H.L.
Beryllium Disease
Human Pathology 1, 25, (1970)

45. Fritz, W., Hoschek, R.
Taschenbuch für den medizinischen Arbeitsschutz und die werksärztliche Praxis
Enke, Stuttgart, (1973)

46. Grey, J., Pioli, E., Williams, W.J.
Diagnosis of Chronic Beryllium Disease
British Medical Journal, 2, 175, (1972)

47. Hardy, H.L.
Beryllium Disease: A Continuing Diagnostic Problem
Amer. J. Med. Sci. 242, 150, (1961)

48. Hardy, H.L.
Reaction to Toxic Beryllium Compounds: Terminology
J. Occup. Med. 4, 532, (1962)

49. Hardy, H.L., Tabershaw, I.R.
Delayed Chemical Pneumonitis Occuring in Workers Exposed to Beryllium Compounds
S. Ind. Hyg. Toxicol. 28, 197, (1946)

50. Hardy, H.L., Kazemi, H., Sprince, N.L.
Current Problem of Differentiating between Beryllium Disease and Sarcoidosis
Annals of the New York Academy of Sciences, 278, 654, (1976)

51. Hardy, H.L., Lorch, S., Rabe, E.W.
United States Beryllium Case Registry 1952-1966
Review of its Methods and Utility
J. Occup. Med. 9, 271, (1967)

52. Hardy, H.L., Stoeckle, J.D., Weber, A.L.
Chronic Beryllium Disease
American Journal of the Medical Sciences
46, 545, (1969)

53. Hasan, F.M., Kazemi, H.
Progress Report - US Beryllium Case Registry 1972
Am. Rev. Resp. Dis. 1252, (1973)

54. Hasan, F.M., Kazemi, H.
Chronic Beryllium Disease: a Continuing Epidemiologic Hazard
Chest 65, 289, (1974)

55. Hazard, J.B.
Pathologic Changes of Beryllium Disease - the Acute Disease
Arch. Ind. Health 19, 179, (1959)

56. Heitmann, H.J.
Lymphozytentransformationstest
diagnostik, 5, 155-158, (1972)

57. Hierholzer, E.
MS: Lymphozyten-Reagibilität auf Phytohämagglutinin P vermindert
Medical Tribune Kongreßbericht, 27, (1973)

58. Higgins, G.M., Levy, B.M.
Reactions within the Lungs of Guinea Pigs to the Intratracheal
Administration of Zinc-Beryllium-Silicat
Am. Ind. Hyg. J. 26, 227-235, (1965)

59. Jacques, A., Witschi, R.
Beryllium Effects on Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in Rat Lungs
Arch. Environm. Health 27, 4, 243-247, (1973)

60. Joynson, D.H., Price, C.D., Pugle, A., Williams, W.J.
Role of 'in vitro' and 'in vivo' Tests of Hypersensitivity in
Beryllium Workers
Journal of Clinical Pathology 30, 20, (1977)

61. Keller, R.
Immunologie und Immunpathologie
Thieme-Verlag, Stuttgart, (1977)

62. Ligo, R.N.
Medical Control
USPHS-Publication Nr. 2173, 47-50, (1972)

63. Lindenmann
Immunologie
Thieme-Verlag, Stuttgart, (1979)

64. Ling, N.R.
Lymphozyte Stimulation
Amsterdam: North-Holland Publishing Company (1968)

65. Mackay, I.R., Sharma, D.L.B., Whittingham, S.
Stress Deficieny of the T-Lymphozyte-System Exemplified by Down-Syndrom
Lancet, 1977 I, 163-166

66. MAK
Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe
Mitteilung XV, Harald-Boldt-Verlag, Boppard, (1979)

67. De Nardi, J.M., Van Ordstrand, H.S., Zielinski, J.F.
Management of Beryllium Workers
in Stokinger, H.E.: Beryllium- its Industrial Hygiene Aspects
Academic Press, 323-327, (1966)

68. Neumüller, O.A.
Römpps Chemie-Lexikon Band I
8. Aufl., Frankh-Verlag, Stuttgart, (1979)

69. Niemöller, H.K.
Über den Beryllium-Hauttest nach Curtis und seine Modifikationen
Int. Arch. Gewebepathologie, 19, 27-34, (1962)

70. Nikitina, L.S., Orlova, A.A., Vasil'eva, E.V.
Concentrations of Immunoglobulines in Berylliosis
J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol. 21,3, 254-260, (1977)

71. Van Ordstrand, H.S., et.al.
Beryllium Poisoning
J.A.M.A. 129, 1084, (1945)

72. Petzow, G., Zorn, H.
Zur Toxikologie berylliumhaltiger Stoffe
Chemiker-Zeitung, 98, 5, 236-241, (1974)

73. Preuss, O.P.
Beryllium and its Compounds
Symposium: Pathophysiologie des Berylliums
Stuttgart, (1976)

74. Radford, E.P., Tepper, L.B.
Summary of Beryllium Symposion, Cincinnati,
Department of Environmental Health, University of Cincinnati,
College of Medicine, (1969)

75. Reeves, A.L.
Umweltgefährdung durch Beryllium
Zbl. Arbeitsmed. 2, 46-49, (1974)

76. Report of Work
done under Contract F 33 615-68C-1492 with WRIGHT-Patterson
AFB, (1970)

77. Schulze, K., Stiefel, Th., Tölg, G., Zorn, H.
Ein Verbundverfahren zur Bestimmung von Beryllium in biologischen Matrices durch flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie
Anal. Chim. Acta 87, 67, (1976)

78. Schulze, K., Stiefel, Th., Tölg, G., Zorn, H.
Analysis of Trace Elements Distributed in Blood
Fresenius Z. Anal. Chim. 300, 189-196, (1980)

79. Shakova, A.P., Sokolov, V.V.
Normal Blood Lymphocytes Blast Transformation in Patients with Berylliosis and Silicosis
Gig. Tr. Prof. Zabol 8, 19-22, (1976)

80. Spencer, H.C. et.al.
Toxicological Study on Beryllium Oxides and Beryllium Containing Exhaust-Products
Aerospaces Medical Research Laboratories,
AMRL-TR 63, 148, (1968)

81. Stiefel, Th.
Spurenanalytische Untersuchungen zur Verteilung von inkorporiertem Beryllium in Vollblut und Serumproteinen
Dissertation, Stuttgart, (1978)

82. Stokinger, H.E.
Experimental Toxicology
USPHS Publication Nr. 2173, 17-33, (1972)

83. Stokinger, H.E.
Recommended Environmental Limits of Exposure
USPHS Publication Nr. 2173, 33-37, (1972)

84. Tepper, L.H.
Beryllium
CRC, Critical Reviews in Toxicology, 235-259, (1972)

85. Vasil'eva, E.V.
Immunologic Assessment of a Model of Experimental Berylliosis
Bull. Exp. Biol. Med. 67, 291-293, (1969)

86. Williams, W.J.
The Nature and Origin of Schaumann Bodies
J. Pathol. Bacteriol. 79, 193-201, (1960)

87. Williams, W.J.
Beryllium Disease - Pathology and Diagnosis
J. Soc. Occup. Med. 27, 93-96, (1977)

88. Williams, W.J., Williams, D.
The Properties and Development of Conchoidal Bodies in Sarcoid-like Granulomas
J. Pathol. Bacteriol. 96, 491-496, (1968)

89. Zeller, J.
Der Lymphozyten-Transformations-Test als 'screening'-Untersuchung zur Feststellung einer spezifischen Sensibilisierung durch Beryllium-sulfat
Dissertation, Tübingen, (1976)

90. Zielinski, J.F.
Statement to the National Academy of Sciences,
Committee on Toxicology, Washington, D.C., (1973)

91. Zorn, H.
Die Lymphozytentransformation als biologischer Parameter bei der Exposition gegenüber verschiedenen Metalloxiden und Metallsalzen, aufgezeigt am Beispiel des Berylliums (Be)
18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, 1978, A.W. Gentner-Verlag, Stuttgart

92. Zorn, H.
Analysen im biologischen Material, Nachweis von Beryllium im Harn, Nachweis von Beryllium im Blut
3. Lieferung 1979, ed. D. Henschler, Verlag Chemie, Weinheim

## Lebenslauf

Am 26.9.1955 wurde ich, Günther Werle, als Sohn des Bankbeamten Karl Werle in Waldshut geboren.
Mutter: Erika Werle, geb. Freitag

| | |
|---|---|
| 1955–1960 | wohnhaft in Säckingen |
| 1960–1963 | wohnhaft in Ulm |
| 1962 | Einschulung in die Martin-Schaffner-Schule in Ulm |
| 1963– | heute wohnhaft in Stuttgart |
| 1963–1966 | Besuch der Heusteig-Schule in Stuttgart |
| 1966–1974 | Besuch des Schickhardt-Gymnasiums in Stuttgart |
| 1974 | Reifeprüfung am Schickhardt-Gymnasium in Stuttgart |
| 1974–1975 | Studium der Medizin an der Universität Hohenheim (Stuttgart-Hohenheim) |
| 1975–1980 | Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| 1976 | Ärztliche Vorprüfung in Reutlingen |
| 1979–1980 | Praktisches Jahr in Stuttgart-Bad Cannstatt und am Olga-Hospital in Stuttgart |
| 1980 | Dritter Teil der ärztlichen Prüfung in Tübingen-Pfrondorf (7.10.1980) und in Stuttgart-Bad Cannstatt (21.10.1980) |
| 1974–1980 | Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes |

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145